

Identifizierung von artifiziellen Liganden eines in Nanodiscs inkorporierten integralen Membranproteins

Marina Pavlidou

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institute of Complex Systems (ICS)
Strukturbiochemie (ICS-6)

Identifizierung von artifiziellen Liganden eines in Nanodiscs inkorporierten integralen Membranproteins

Marina Pavlidou

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Schlüsseltechnologien / Key Technologies

Band / Volume 80

ISSN 1866-1807

ISBN 978-3-89336-942-3

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Herausgeber
und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Tel.: +49 2461 61-5368
Fax: +49 2461 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
www.fz-juelich.de/zb

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2014

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Schlüsseltechnologien / Key Technologies, Band / Volume 80

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2013)

ISSN 1866-1807

ISBN 978-3-89336-942-3

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter www.fz-juelich.de/zb/juwel

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder
unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	MEMBRANPROTEINE	1
1.1.1	Klassen von Membranproteinen	1
1.1.2	Die Funktion von Membranproteinen	2
1.1.3	Membranproteine als Zielproteine für pharmakologische Wirkstoffe	4
1.2	UNTERSUCHUNG VON MEMBRANPROTEINEN	5
1.2.1	Modellmembranen	6
1.2.2	Zellfreie Expression von Membranproteinen	10
1.3	BAKTERIORHODOPSIN	11
1.3.1	<i>Halobacterium salinarum</i>	11
1.3.2	Die Funktionsweise von Bakteriorhodopsin	12
1.3.3	Bakteriorhodopsin als Modell eines integralen Membranproteins	13
1.3.4	Bakteriorhodopsin in Nanodiscs	14
1.4	PHAGENDISPLAY	15
1.4.1	Morphologie und Lebenszyklus filamentöser Phagen	15
1.4.2	Das Prinzip von Phagendisplayselektionen	17
1.4.3	Anwendungen von Phagendisplay	18
1.4.4	Phagendisplay und Membranproteine	19
1.5	ZIEL DIESER ARBEIT	20
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	MATERIAL	22
2.1.1	Bakterienstämme	22
2.1.2	Plasmide	23
2.1.3	Oligonukleotide	23
2.1.4	Antikörper, Enzyme und Peptide	24
2.1.5	Kits	25
2.1.6	Nährmedien, Puffer und andere Lösungen	26
2.1.7	Größenmarker	29
2.1.8	Chemikalien	29
2.1.9	Geräte und sonstige Materialien	30
2.1.10	Software	31
2.2	METHODEN	32
2.2.1	Gentechnische Methoden	32
2.2.2	Methoden der Proteinbiochemie	34
2.2.3	Herstellung von Nanodiscs	38
2.2.4	Immunologische Methoden	41
2.2.5	Phagendisplay	42
3	ERGEBNISSE	46
3.1	HERSTELLUNG VON NANODISCS	46
3.1.1	Optimierung der Nanodisc-Herstellung	46
3.1.2	Herstellung von Nanodiscs im präparativen Maßstab	48
3.1.3	Stabilität von Nanodiscs in Detergens	50
3.2	HERSTELLUNG VON MIT BAKTERIORHODOPSIN BELADENEN NANODISCS	51
3.2.1	Mutagenese des bR-Expressionsplasmids	52
3.2.2	Zellfreie Proteinsynthese von Bakteriorhodopsin in vorgeformte Nanodiscs	52
3.3	IMMOBILISIERUNG BELADENER UND UNBELADENER NANODISCS AUF MIKROTITERPLATTEN	57
3.4	SELEKTION VON LIGANDEN GEGEN BAKTERIORHODOPSIN-BELADENE NANODISCS ÜBER PHAGENDISPLAY	59
3.4.1	Analyse der Selektion 1	60
3.4.2	Analyse der Selektion 2	64
3.4.3	Zusammenfassung der Analysen von Selektion 1 und Selektion 2	66
3.5	EPITOPKARTIERUNG DER PHAGENKLONE GEGEN BAKTERIORHODOPSIN	68

4	DISKUSSION	71
4.1	PRÄPARATION DES ZIELPROTEINS	72
4.1.1	Effektivere Nanodisc-Assemblierung durch langsames Entfernen des Detergens	73
4.1.2	Nanodiscs sind auch bei hohen Konzentrationen stabil	75
4.1.3	Erfolgreicher Einbau von bR in Nanodiscs über zellfreie Proteinsynthese	75
4.1.4	Zellfreie Proteinsynthese als allgemeine Methode zum Einbau von Membranproteinen in Nanodiscs	76
4.2	PHAGENDISPLAY GEGEN MIT BAKTERIORHODOPSIN BELADENE NANODISCS LIEFERTE BAKTERIORHODOPSIN-SPEZIFISCHE LIGANDEN	77
4.2.1	Voraussetzungen für den erfolgreichen Einsatz von Nanodiscs im Phagendisplay	78
4.2.2	Aus beiden Selektionen wurden bR-spezifische Klone isoliert	79
4.2.3	Bakteriorhodopsin-spezifische Klone zeigten keine dominierende Aminosäuresequenz	81
4.2.4	Nanodisc-spezifische Klone enthielten ein bekanntes Motiv	82
4.2.5	Optimierungsvorschläge für Phagendisplayselektionen gegen Zielproteine in Nanodiscs	84
4.3	DIE SELEKTIERTEN LIGANDEN BANDEN EIN NICHT-LINEARES EPITOP VON BAKTERIORHODOPSIN	86
4.4	RELEVANZ	88
5	ZUSAMMENFASSUNG	90
6	SUMMARY	91
7	LITERATUR	92
8	ANHANG	100
8.1	SEQUENZEN	100
8.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
8.3	AMINOSÄUREN	103
8.4	PUBLIKATIONEN UND POSTERPRÄSENTATIONEN	104
8.5	DANKSAGUNG	105
8.6	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	106

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Schematische Darstellung verschiedener Klassen von Membranproteinen	2
Abb. 2 Schematische Darstellung von Modellmembranen	8
Abb. 3 Schematische Darstellung einer Nanodisc	10
Abb. 4 Strukturmodell von bR (PDB: 1R2N)	13
Abb. 5 Schematischer Aufbau des filamentösen M13-Phagen	16
Abb. 6 Prinzip einer Phagendisplayselektion	18
Abb. 7 Größenausschlusschromatogramme von Nanodisc-Testassemblierungen	48
Abb. 8 Größenausschlusschromatogramme einer präparativen Nanodisc-Assemblierung	49
Abb. 9 Stabilität von Nanodiscs im nicht-ionischen Detergens Tween 20	51
Abb. 10 Sequenzierergebnis der Mutagenese von pEXP5-CT/bR	52
Abb. 11 Schematische Darstellung der Herstellung von bR-beladenen Nanodiscs	53
Abb. 12 SDS-PAGE der Reinigung von bR-beladenen Nanodiscs über Ni-NTA	54
Abb. 13 Western Blot Analyse der Reinigung von bR-beladenen Nanodiscs über Ni-NTA	55
Abb. 14 Größenausschlusschromatogramme von bR-beladenen Nanodiscs	56
Abb. 15 Absorptionsspektrum von dunkeladaptierten bR-beladenen Nanodiscs	57
Abb. 16 Kopplung von bR-beladenen und unbeladenen Nanodiscs auf Mikrotiterplatten	59
Abb. 17 Anreicherungs-ELISA der Selektion 1	61
Abb. 18 Einzelphagen-ELISA der Selektion 1	62
Abb. 19 Sequenzalignment von Peptiden, welche auf der Oberfläche von selektierten Phagen aus der Phagendisplay Selektion 1 präsentiert wurden	63
Abb. 20 Anreicherungs-ELISA der Selektion 2	64
Abb. 21 Einzelphagen-ELISA der Selektion 2	65
Abb. 22 Sequenzalignment von Peptiden, welche auf der Oberfläche von selektierten Phagen aus der Phagendisplay Selektion 2 präsentiert wurden	66
Abb. 23 Einzelphagen-ELISA repräsentativer Klone	67
Abb. 24 Epitopkartierung der selektierten Phagenklone gegen bR	70
Abb. 25 Strukturformeln von DMPC und Lipid A aus <i>E. coli</i>	84
Abb. 26 Kristallstruktur von bR (PDB: 1IW6)	87

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Genotypen und Referenzen der verwendeten Bakterienstämme	22
Tabelle 2: Resistenzen, Beschreibungen und Referenzen der verwendeten Plasmide	23
Tabelle 3: Oligonukleotide, die zur Klonierung und Sequenzierung eingesetzt wurden	23
Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper	24
Tabelle 5: Liste der verwendeten Enzyme	24
Tabelle 6: Liste der Peptide, welche extramembrane Bereiche von bR darstellen	25
Tabelle 7: Liste der kommerziell erworbenen Kits	25
Tabelle 8: Liste der verwendeten Nährmedien	26
Tabelle 9: Liste allgemein verwendeter Puffer	26
Tabelle 10: Lösungen für das Phagendisplay	26
Tabelle 11: Puffer und Gele für die SDS-PAGE	27
Tabelle 12: Lösungen für Western Blot-Experimente	27
Tabelle 13: Lösungen zur Reinigung der TEV-Protease	28
Tabelle 14: Lösungen zur Reinigung von MSP1	28
Tabelle 15: Lösungen zur Assemblierung von Nanodiscs	28
Tabelle 16: Lösungen zur Reinigung von bR-beladenen Nanodiscs	29
Tabelle 17: Liste der verwendeten Größenmarker	29
Tabelle 18: Liste der verwendeten Chemikalien	29
Tabelle 19: Liste der verwendeten Geräte	30
Tabelle 20: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 21: Liste der verwendeten Software	31
Tabelle 23: Absorptionsmaxima (λ_{max}) von trimerem und monomerem bR	41

1 EINLEITUNG

1.1 MEMBRANPROTEINE

Biologische Membranen bilden Barrieren zur Abgrenzung von Zellen und von Organellen innerhalb eukaryotischer Zellen. Sie bestehen hauptsächlich aus Phospholipiden, welche sich zu einer Phospholipiddoppelschicht zusammenlagern, indem sich die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide nach außen und die hydrophoben Fettsäureanteile nach innen lagern. Proteine, die in Membranen eingelassen sind oder mit diesen assoziiert sind, können bis zu 50 % der Masse von biologischen Membranen ausmachen (Luckey *et al.*, 2008).

1.1.1 Klassen von Membranproteinen

Membranproteine, die fest in die Membran integriert sind, werden integrale Membranproteine genannt. Eine Untersuchung von Genomen verschiedener Organismen aus den drei Domänen des Lebens ergab, dass 20 bis 30 % der offenen Leserahmen für integrale Membranproteine kodieren (Wallin und von Heijne, 1998). Membranproteine, die sich in die Membran einlagern, diese aber nicht durchspannen, werden als monotopisch bezeichnet. Transmembranproteine sind integrale Membranproteine, welche die Membran vollständig durchspannen. Dabei unterscheidet man zwischen bitopischen Transmembranproteinen, die die Membran nur einmal durchspannen und polytopischen Transmembranproteinen, die sich durch mehrere Transmembrandurchgänge, welche über Loops miteinander verbunden sind, auszeichnen (Abb. 1). Die Transmembrandurchgänge polytopischer Transmembranproteine können entweder aus α -Helices oder aus β -Barrels bestehen. α -helikale Membranproteine kommen am häufigsten vor und sind am besten untersucht. Die Helices bestehen im Durchschnitt aus 20, vor allem hydrophoben, Aminosäuren. Die β -Barrel-Proteine bestehen aus β -Faltblättern, welche sich zu einer Fassstruktur zusammenlagern und dadurch Poren bilden. Die Aminosäuren, welche die Fassstruktur ausbilden, sind je nachdem, ob sie nach außen zum Lipid oder in das Innere der Pore zeigen, entweder hydrophob oder polar. β -Barrel-Proteine kommen vor allem in der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien oder in der äußeren Membran von Mitochondrien und Chloroplasten vor.

Eine andere Gruppe von Membranproteinen stellen periphere Membranproteine dar (Abb. 1). Diese sind locker mit der Membran über elektrostatische oder van der Waals-Wechselwirkungen entweder über die Lipidkopfgruppen oder über andere Membranproteine verbunden (Abb. 1). Andere Membranproteine werden über kovalent gebundene Lipidanker in der Membran gehalten. Beispielsweise sind viele dieser Proteine mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verknüpft, welches sich in das äußere Blatt der Lipiddoppelschicht einlagert (Luckey *et al.*, 2008).

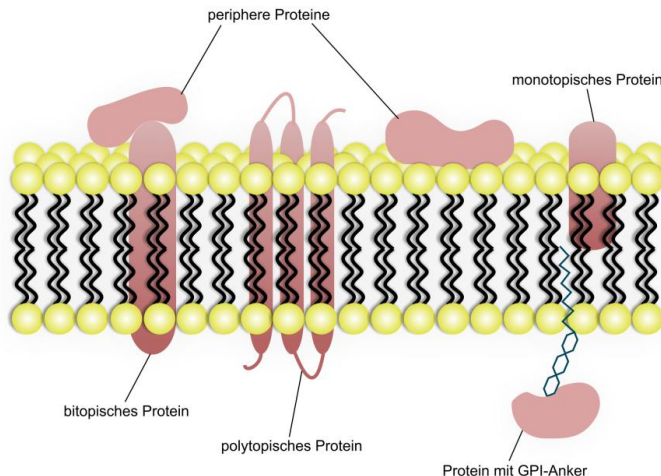


Abb. 1 Schematische Darstellung verschiedener Klassen von Membranproteinen. Periphere Membranproteine können mit der Membran oder anderen Membranproteinen assoziiert oder über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) mit der Membran verankert sein. Monotopische Proteine durchdringen nur ein Blatt der Membran. Integrale Membranproteine durchspannen die Membran vollständig und unterscheiden sich in der Anzahl der Transmembrandurchgänge (bitopisch, polytopisch).

1.1.2 Die Funktion von Membranproteinen

Membranproteine führen in der Zelle wichtige Funktionen aus und sind an vielen, essentiellen Prozessen beteiligt, indem sie als Enzyme, Transporter und Kanäle oder als Rezeptoren fungieren (Luckey *et al.*, 2008).

Membranständige Enzyme nehmen beispielsweise an Elektronentransportketten oder an Redoxreaktionen teil oder sind am Metabolismus von Membrankomponenten wie Sterolen oder Phospholipiden beteiligt. Viele membranständige Enzyme benötigen spezielle Lipide, um aktiv zu sein. Beispiele für membranständige Enzyme sind die Cytochrome P450, welche als Häm-tragende Monooxygenasen am Metabolismus vieler Substanzen wie Steroiden und Vitaminen beteiligt sind. In der Pharmazie spielen Cytochrome P450 eine besondere Rolle, da sie lipophile Xenobiotika in polare

Zwischenprodukte umwandeln und so deren weitere Umwandlung oder Exkretion ermöglichen. In Eukaryoten sind Cytochrome P450 an die innere Membran der Mitochondrien oder an das Endoplasmatische Reticulum (ER) gebunden (Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000).

Eine weitere Funktion von Membranproteinen ist der Transport von Molekülen über eine Vielzahl verschiedener Mechanismen durch die Membran. Der Transport von Molekülen kann entweder passiv über Poren und Kanäle entlang eines Konzentrationsgefälles erfolgen oder über aktiven Transport unter Energieverbrauch. Aktive Transporter können Moleküle entgegen eines Konzentrationsgefälles oder elektrischen Gefälles in der Zelle ansammeln. Primäre aktive Transporter wie beispielsweise ABC-Transporter besitzen eine ATP-Bindungskassette (ABC), die ATP hydrolysiert, um Energie für den Transportvorgang zu liefern. Sekundäre Transportvorgänge benutzen Ionengradienten, welche durch primäre aktive Transporter aufgebaut wurden, um über Symport und Antiport den Transport eines Substrats zu ermöglichen. Symport und Antiport werden durch Carrierproteine ausgeführt, die Komplexe mit ihren Substraten bilden und über eine Konformationsänderung die Substrate durch die Membran schleusen. Ein besonderer Mechanismus von aktivem Transport ist das Gruppentranslokationssystem von Bakterien, welches die Aufnahme von Zuckern steuert. Während der Aufnahme werden diese durch ein Phosphotransferasesystem phosphoryliert, sodass eine Rückdiffusion vermieden wird (Luckey et al., 2008).

Membranproteine spielen eine wichtige Rolle in der Aufnahme und Weitergabe von Signalen. Membranständige Rezeptoren können als Ionenkanal-gekoppelte, G-Protein-gekoppelte oder Enzym-gekoppelte Rezeptoren auftreten (Cooper, 2000). Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren kommen hauptsächlich in Nervenzellen vor und werden durch Neurotransmitter kontrolliert. Die Bindung des Neurotransmitters führt zu einer Änderung des Membranpotentials und dadurch zur Weitergabe von Nervenimpulsen. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) binden eine Vielzahl von interzellulären Botenmolekülen oder sensorischen Signalen (Photonen, Hormone, Neurotransmitter etc.), wodurch eine Interaktion mit einem G-Protein stattfindet, welches eine Signalkaskade in Gang setzt und zu einer zellulären Antwort führt (Kapitel 1.1.2.1). Enzym-gekoppelte Rezeptoren durchspannen die Membran nur einmal. Die Bindung eines Liganden auf der Außenseite des Proteins führt zur Katalyse einer enzymatischen Reaktion an der Innenseite der Membran. Die meisten Enzym-gekoppelten Rezeptoren agieren als Tyrosinproteinkinasen, die zelluläre Proteine als Folge eines von außen kommenden Signals phosphorylieren.

Die Infektion von Zellen mit Viren erfolgt ebenfalls über Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Im Fall des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) beispielsweise dockt das Virus über den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen an, um in die Zelle einzudringen (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzmann *et al.*, 1984).

Membranproteine regulieren außerdem den intrazellulären Transport von Molekülen in Vesikeln, indem sie als Vesikeltransportproteine an der Bildung, Bewegung und Auflösung von Transportvesikeln beteiligt sind. Weitere Funktionen von Membranproteinen sind die Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und die Verbindung von Zellen.

1.1.3 Membranproteine als Zielproteine für pharmakologische Wirkstoffe

Membranproteine spielen in der pharmazeutischen Industrie eine besondere Rolle. Eine umfassende Untersuchung aller von der amerikanischen Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde (FDA) zugelassenen Wirkstoffe in Hinblick auf ihre Anzahl, Charakteristika und biologische Diversität ergab, dass Membranproteine die größte Klasse von Zielproteinen für pharmakologische Wirkstoffe darstellen. Die Zielproteine von allein über 50 % der Wirkstoffe stammen hauptsächlich aus nur vier Proteinfamilien: GPCRs der Familie A, nukleare Rezeptoren, ligandengesteuerte Ionenkanäle und spannungsgesteuerte Ionenkanäle. Zu den am häufigsten vorkommenden Zielproteinen gehören außerdem Vertreter aus den Familien der penicillinbindenden Proteine, der Myeloperoxidase-ähnlichen Proteine, der Natrium:Neurotransmitter Symporter, der Typ II DNA-Isomerasen, der Fibronektine Typ III und der Cytochrome P450. Die Zielproteine mit den meisten Wirkstoffen sind der Glukokortikoidrezeptor und der Histamin H₁ Rezeptor. Insgesamt sind 60 % aller Zielproteine membranständige Proteine (Overington *et al.*, 2006).

1.1.3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Die bei weitem am häufigsten vorkommenden Zielproteine für pharmakologische Wirkstoffe sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Aufgrund ihrer wesentlichen Rolle in der sensorischen und hormonellen Signaltransduktion führen Dysfunktionen von GPCRs häufig zu Krankheiten.

GPCRs kommen ausschließlich in Eukaryoten vor und stellen eine der größten Proteinfamilien des Menschen dar. Sie bestehen aus sieben α -helikalen Transmembrandomänen, welche als Bündel in der Membran angeordnet sind. Der N-Terminus ist auf der extrazellulären Seite und der C-Terminus auf der intrazellulären Seite lokalisiert. Die Ligandenbindung erfolgt in einer Tasche, die von den Transmembranhelices gebildet wird. Die Bindung des Liganden hat eine konformelle

Änderung des Rezeptors zur Folge, welche zu einer erhöhten Affinität zu einem heterotrimerem G-Protein führt. Der Rezeptor bindet das G-Protein, an dem ein Austausch von GDP gegen GTP erfolgt, woraufhin die α -Untereinheit des G-Proteins aufgrund der GTP-Bindung von der $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert. Die α -Untereinheit interagiert mit einem Effektor z. B. einer Adenylatcyclase, welcher die Bildung eines sekundären Botenstoffes wie cAMP katalysiert. Die Konzentrationserhöhung des sekundären Botenstoffes führt zu weiteren Ereignissen in der Zelle wie beispielsweise dem Abbau von Glykogen aufgrund der Phosphorylierung von speziellen Enzymen durch die vom cAMP aktivierte Proteinkinase A (Stryer 1995; Bikker *et al.*, 1998).

Bei Wirbeltieren unterscheidet man drei Klassen von GPCRs: die Rhodopsin/ β -adrenergen Rezeptor-ähnlichen Rezeptoren, die Calcitonin/Glucagon-ähnlichen Rezeptoren und die metabotropen Glutamatrezeptoren. Die am besten untersuchten und für die Arzneimittelforschung wichtigsten GPCRs sind die, die zur Familie der Rhodopsine gehören. Beispiele von Wirkstoffen, die mit GPCRs interagieren, sind Betablocker, Antihistaminika oder Opioide.

1.2 UNTERSUCHUNG VON MEMBRANPROTEINEN

Obwohl, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, Membranproteine eine bedeutende Rolle in der Arzneimittelforschung und der Behandlung von Krankheiten spielen, sind sie im Vergleich zu löslichen Proteinen weniger gut untersucht. Dies liegt hauptsächlich an ihrer starken Hydrophobizität, welche das Arbeiten mit diesen Proteinen sehr erschwert. Von tausenden aufgeklärten Proteinstrukturen sind nur 425 die von Membranproteinen (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>).

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen von Membranproteinen werden oft dadurch behindert, dass Überexpressionen in Expressionswirten sowie die Isolierung der Proteine aus den Membranen ihrer Wirtsorganismen meist nur geringe Ausbeuten liefern (Drew *et al.*, 2003; Seddon *et al.*, 2004). Membranproteine können nach dem Herauslösen aus ihrer natürlichen Membrenumgebung nicht in wässrigen Lösungen gehalten werden, da die Transmembranbereiche der Proteine stark hydrophob sind und miteinander interagieren würden, um eine Minimierung der polaren Wassermoleküle an den apolaren Oberflächen zu erreichen (Tanford, 1980). Dies hat ein Aggregieren und Präzipitieren der Proteine zur Folge. Das Hinzufügen von grenzflächenaktiven Substanzen, welche aus polaren und unpolaren Anteilen bestehen, verhindert Aggregationen, indem Wassermoleküle verdrängt und Oberflächenspannungen reduziert werden. Für die Solubilisierung von Membranproteinen werden häufig Detergenzien oder Lipide als oberflächenaktive

Substanzen genutzt. Membranmimetika, welche bei der Untersuchung von Membranproteinen eingesetzt werden, sind in Kapitel 1.2.1 beschrieben. Die Rekonstitution von gereinigten Membranproteinen in solche Systeme ist allerdings nicht trivial und limitiert die Anwendung vieler biophysikalischer Methoden wie Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), Röntgenkristallographie, Circular dichroismus, Bindungsstudien oder kinetische Charakterisierungen (Seddon *et al.*, 2004).

1.2.1 Modellmembranen

Der erste Schritt in der Solubilisierung von Membranproteinen wird für gewöhnlich mit Detergenzien erreicht (le Maire *et al.*, 2000). Wegen ihres amphipathischen Charakters sind sie in der Lage, Fette und andere hydrophobe Moleküle zu lösen. Detergenzien lagern sich in Wasser ab einer bestimmten Konzentration, der so genannten kritischen Mizellbildungskonzentration (cmc), zu Mizellen zusammen (Abb. 2a). Die apolaren Teile lagern sich weg vom Wasser in das Innere der Mizelle, während die polaren Kopfgruppen zur wässrigen Lösung hin zeigen. Detergenzien werden in ionische (anionische oder kationische), nicht-ionische und zwitterionische Detergenzien unterteilt. Sie können aber auch in Bezug auf ihre Fähigkeit zu Solubilisieren und/oder Proteine zu denaturieren in starke oder milde Detergenzien unterteilt werden. Sie können biologische Membranen in ihre Komponenten auflösen, wobei Lipide und Detergenzien gemischte Mizellen bilden und Membranproteine von den Mizellen umgeben werden (Gohon und Popot, 2003).

Da für das Herauslösen von Membranproteinen aus Membranen starke Detergenzien benötigt werden, besteht das Risiko, dass die Proteine denaturieren und ihre Funktion verlieren (Brotherus *et al.*, 1979; Breyton *et al.*, 1997). Ob ein Detergens denaturierend wirkt, hängt von seiner Konzentration sowie dem jeweiligen Membranprotein ab und muss meist empirisch ermittelt werden. Detergenzien führen zur Destabilisierung von Membranproteinen, indem sie beispielsweise Lipide entfernen, welche für die Stabilität und Funktion der Membranproteine notwendig wären (Popot, 2010) oder indem sie aufgrund von Konformationsänderungen zur Dissoziation von Untereinheiten der Membranproteine führen. Das Auflösen der oligomeren Form des Proteins führt dazu, dass Proteinmonomere stärker von Inaktivierung betroffen sind, da vorher geschützte Bereiche freigelegt werden oder die Flexibilität der Proteinkette erhöht wird (Bowie, 2001). Selbst wenn das Protein nicht durch Detergenzien destabilisiert wird, können Detergenzien weitere Untersuchungen der Proteine behindern, indem sie beispielsweise die Substratbindung beeinflussen (Hosea und Guengerich, 1998).

Membranmodelle, welche auf Lipiden basieren, ahmen die natürliche Lipiddoppelschicht besser nach. Gemischte Mizellen aus Detergenzien und Lipiden

können zur Reinigung von Membranproteinen eingesetzt werden. Die hydrophoben Regionen der Proteine werden durch Anlagerung der hydrophoben Gruppen der in Lösung befindlichen Lipide in Lösung gehalten. Manche Proteine, wie z. B. das Opsin, sind in Detergenzien instabil, aber stabil in Lipid/Detergens-Mizellen (Seddon *et al.*, 2004). Bizellen sind Membranmodelle, die ebenfalls aus Lipiden und Detergenzien bestehen (Abb. 2b). Der Detergensanteil ist allerdings geringer als in gemischten Mizellen. Der zentrale, planare Teil der Bizelle besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, welche an den Enden von Detergenzien oder Phospholipiden mit kurzen Acylketten vor der wässrigen Umgebung geschützt wird. Da Bizellen Charakteristika einer Doppelschicht aufweisen, bieten sie eine geeignetere Umgebung für Membranproteine. Bizellen weisen allerdings eine starke Heterogenität in Bezug auf Form, Größe und Zusammensetzung auf, sind instabil und limitiert in der Anzahl der möglichen Detergens/Lipid-Kombinationen (Raschle *et al.*, 2010).

Ein Membranmodell, das häufig für die Untersuchung von Struktur und Funktion von Membranproteinen genutzt wird, ist das Liposom (Rigaud *et al.*, 1995) (Abb. 2c). Liposomen können sich spontan formen, wenn Lipide einer wässrigen Lösung ausgesetzt sind. Dabei handelt es sich um geschlossene Vesikel bestehend aus einer oder mehreren Lipiddoppelschichten (unilamellar, multilamellar), in die das Membranprotein eingelagert wird. Liposomen mit eingelagerten Membranproteinen werden Proteoliposomen genannt. Proteoliposomen weisen allerdings einige Nachteile auf: sie sind je nach Herstellungsweise heterogen bezüglich ihrer Masse und vor allem kleine unilamellare Liposome tendieren dazu zu aggregieren. Ein weiterer Nachteil ist, dass das Membranprotein in zwei Orientierungen in die Lipidschicht eingebaut werden kann. Geht man davon aus, dass beide Orientierungen mit gleicher Wahrscheinlichkeit vorkommen, sind in unilamellaren Liposomen 50 % der potentiellen Bindestellen von der Außenseite des Liposoms nicht zugänglich. Für die Untersuchung von Transportaktivitäten oder anderen Vorgängen, bei denen die Topologie des Proteins eine Rolle spielt, muss sichergestellt werden, dass alle Proteine die gleiche Orientierung aufweisen, damit die Substrate in die gleiche Richtung gepumpt werden (Seigneuret *et al.*, 1985).

Ein alternatives Membranmimetikum stellen Amphipole dar. Ein Amphipol ist ein amphipathisches Polymer mit vielen hydrophoben Ketten, welche an der hydrophoben Oberfläche der Membranproteine über mehrere Kontaktpunkte assoziieren (Breyton *et al.*, 2010), wodurch Membranproteine in einer detergensfreien Umgebung in Lösung gehalten werden können. Da Amphipole zu schwach sind um Membranproteine zu extrahieren und zu solubilisieren, werden dafür Detergenzien eingesetzt, welche anschließend durch Amphipole ersetzt werden. Obwohl Amphipole

noch eine recht neue Klasse von Membranmimetika darstellen, wurden sie bereits auf eine ganze Reihe von Membranproteinen angewandt, um diese in Lösung zu halten.

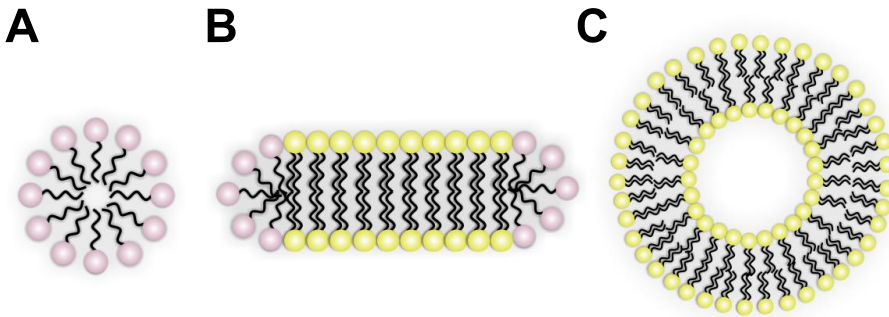


Abb. 2 Schematische Darstellung von Modellmembranen. Detergens- und Lipidmoleküle bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe (Kreis) und hydrophoben Seitenketten (gewellte Linien). Viele Detergenzien (rosa) haben eine hydrophobe Kohlenwasserstoffkette. Lipide (gelb) besitzen in der Regel zwei Kohlenwasserstoffketten. **A)** Mizelle aus Detergenzmolekülen. **B)** Bizellen aus Detergenzien und Lipiden. **C)** Unilamellares Liposom bestehend aus einer sphärisch angeordneten Lipiddoppelschicht. Größenverhältnisse stimmen nicht mit der Realität überein.

1.2.1.1 Nanodiscs

Ein vielversprechendes Modellmembransystem stellen Nanodiscs dar. Nanodiscs sind diskoidale Strukturen bestehend aus einer Phospholipiddoppelschicht, die von zwei Kopien eines amphipathischen Gerüstproteins (englisch: membrane scaffold protein, MSP), umgeben ist (Bayburt *et al.*, 2002) (Abb. 3). Das als Gerüstprotein verwendete MSP ist ein Derivat des Apolipoprotein A-I, einem natürlich vorkommendem amphipathischen α -helikalen Protein, welches am Transport von überschüssigem Cholesterin aus den peripheren Geweben zurück in die Leber (reverser Cholesterintransport) beteiligt ist. *In vivo* binden zwei Moleküle Apolipoprotein A-I Phospholipide und bilden diskoidale High Density Lipoprotein (HDL)-Partikel, welche mit einem ABC-Transporter interagieren. Cholesterin wird aus den Zellen transportiert und über Veresterung in die HDL-Partikel inkorporiert. Durch zunehmende Aufnahme von Cholesterinestern werden aus den diskoidalen HDL-Partikeln reife, sphärische HDL-Partikel, welche die Cholesterinester zur Leber transportieren (Ohashi *et al.*, 2005). *In vitro* können diskoidale HDL-Partikel durch Mischen von Apolipoprotein A-I und Lipiden gebildet werden.

Beim MSP wurde die N-terminale globuläre Domäne des Apolipoprotein A-I deletiert. Nanodiscs werden spontan gebildet, indem MSP in einem bestimmten molaren

Verhältnis mit detergentsolubilisierten Lipiden gemischt und das Detergens anschließend entfernt wird. Für den Einbau eines Membranproteins in Nanodiscs kann dieses in gereinigter Form und mit Detergenzien solubilisiert zum Assemblierungsansatz in einem bestimmten Verhältnis zu den anderen Komponenten hinzugefügt werden. Eines der ersten synthetischen Gene, das auf Basis des Apolipoprotein A-I konstruiert wurde, kodiert für das MSP1 und ermöglicht die Assemblierung von Nanodiscs mit einem Durchmesser von ~ 10 nm (Bayburt *et al.*, 2002). Weitere MSP-Konstrukte folgten, bei denen Helixsegmente entfernt oder hinzugefügt oder weitere Aminosäuren am N-Terminus entfernt wurden. Mit diesen können Nanodiscs von 6 nm bis 17 nm Durchmesser gebildet werden (Denisov *et al.*, 2004; Grinkova *et al.*, 2010; Hagn *et al.*, 2013).

Nanodiscs haben gegenüber anderen Modellmembranen zahlreiche Vorteile. Sie bieten Membranproteinen eine klar abgetrennte Phospholipiddoppelschicht. Da Nanodiscs vom MSP zusammengehalten werden, zeichnen sie sich durch hohe Monodispersität und Homogenität aus. Die Partikelgröße kann durch die Wahl des MSPs präzise verändert werden. Nanodiscs sind über einen weiten Temperaturbereich stabil (Nath *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu Liposomen sind Membranproteine in Nanodiscs von beiden Seiten der Membran zugänglich. Die Membranproteine befinden sich in einem fast physiologischen, detergentsfreiem Umfeld, in dem sie sich korrekt falten und native Epitope ausbilden können. Spezielle Lipide, welche manche Membranproteine für ihre Funktion benötigen, können leicht in die Nanodiscs eingebaut werden.

Mit Hilfe von Nanodiscs wurden strukturelle und funktionelle Methoden, welche zuvor auf lösliche Proteine beschränkt waren, auf Membranproteine angewendet (Borch und Hamann, 2009). Anhand zahlreicher Membranproteine konnte gezeigt werden, dass in Nanodiscs inkorporierte Membranproteine in der NMR eingesetzt werden können (Glück *et al.*, 2009; Raschle *et al.*, 2010). Nanodiscs können auch für die Bestimmung von Kinetiken von Interaktionen zwischen Membranproteinen und löslichen Liganden mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) verwendet werden (Borch *et al.*, 2008; Glück *et al.*, 2011).

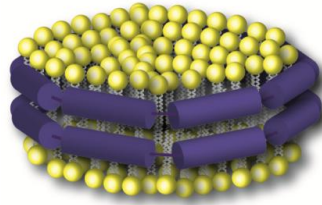


Abb. 3 Schematische Darstellung einer Nanodisc. Lipide (gelb) formen eine Lipiddoppelschicht, die von zwei MSP-Molekülen (blau) ringförmig umgeben wird.

1.2.2 Zellfreie Expression von Membranproteinen

Die Expression von Membranproteinen stellt einen Engpass in der Erforschung von Membranproteinen dar. Die Überexpression dieser Proteine in heterologen Systemen ist für den Expressionswirt oft toxisch, da die Membranen der Zelle durch Überladung destabilisiert werden. Aufgrund ihrer starken Hydrophobizität neigen Membranproteine zur Fehlfaltung und Aggregation, was oft einen proteolytischen Abbau zur Folge hat (Wagner *et al.*, 2006). Häufig wird die Bildung von Einschlusskörpern bei der Expression von Membranproteinen beobachtet. Während β -Barrel-Proteine aus Einschlusskörpern isoliert und zurückgefaltet werden können (Bannwarth und Schulz, 2003), gibt es kaum Beispiele für funktionale, aus Einschlusskörpern gereinigte α -helikale Membranproteine (Kiefer, 2003). Insgesamt liefern *in vivo* Expressionen nur geringe Ausbeute von funktionalen Membranproteinen.

Zellfreie Proteinsynthese wird immer häufiger für die Expression von Membranproteinen in Betracht gezogen, da Probleme, die auf die Lebensfähigkeit von Zellen zurückgehen, umgangen werden. Bei der zellfreien Proteinsynthese erfolgt die Expression eines Proteins außerhalb von Zellen in einem Reaktionsgefäß, in dem alle Komponenten, welche für Transkription und Translation benötigt werden, zusammengegeben werden. Die Komponenten für den Translationsapparat stammen aus einem lysierten Zellextrakt. Weitere Komponenten wie RNA-Polymerase, Aminosäuren, DNA und ein ATP-Regenerationssystem werden separat hinzugefügt. Die Offenheit des zellfreien Systems erlaubt die Zugabe von zusätzlichen Substanzen, welche Ausbeute, Löslichkeit und Faltung verbessern (Schwarz *et al.*, 2008). Werden Membranproteine ohne die Zugabe von Lipiden und Detergenzien exprimiert, präzipitieren diese. Während für das Auflösen von Einschlusskörpern stark denaturierende Substanzen benötigt werden, lassen sich diese Präzipitate durch Detergenzien solubilisieren (Klammt *et al.*, 2004).

Um das Präzipitieren des exprimierten Membranproteins zu verhindern, können Detergenzien zu der Reaktion hinzugefügt werden, welche diese dann in Form von Proteomizellen in Lösung halten. Gute Ergebnisse konnten dabei mit Detergenzien

erreicht werden, die eine geringe cmc besitzen. Zu hohe Konzentrationen von Detergenzien können allerdings inhibitorische Effekte auf die Transkription und Translation haben. Da Detergenzien Proteine denaturieren können, besteht die Möglichkeit Detergenzien durch Lipide zu ersetzen und so einen Einbau der Membranproteine in Liposomen zu ermöglichen (Kalmbach *et al.*, 2007). Der genaue Mechanismus des Einbaus des Membranproteins in die Membran des Liposoms ist noch unbekannt, aber abhängig von der Phasenübergangstemperatur des Lipids, seiner Länge und der Dicke der Doppelschicht.

Nanodiscs können auch zur Erhöhung der Löslichkeit von Membranproteinen aus zellfreien Proteinsyntheseansätzen eingesetzt werden (Katzen *et al.*, 2009). Die Zugabe von vorgeformten, leeren Nanodiscs zu den Reaktionen kann zum direkten Einbau von korrekt gefalteten und aktiven Membranproteinen in die Nanodiscs führen (Katzen *et al.*, 2008). Der hier zu Grunde liegende Mechanismus ist ebenfalls unbekannt. Verschiedene Membranproteine, darunter auch das α -helikale Transmembranprotein Bakteriorhodopsin (bR), konnten dadurch schon in Nanodiscs inkorporiert werden (Katzen *et al.*, 2008; Lyukmanova *et al.*, 2010). Alternativ zu diesem Ansatz können durch Zugabe von MSP kodierender DNA und Liposomen zur zellfreien Expression die Nanodiscs parallel zur Expression des Membranproteins gebildet und das Membranprotein in diese eingebaut werden (Cappuccio *et al.*, 2008). Beide Methoden stellen Alternativen zum Einbau von Membranproteinen in Nanodiscs über Assemblierung in Gegenwart von Detergenzien dar. Sie haben den Vorteil, dass das Membranprotein nach Expression nicht erst extrahiert und rekonstituiert werden muss, wie das in dem gängigen Protokoll zur Beladung von Nanodiscs mit Membranproteinen (Kapitel 1.2.2.) der Fall ist. Das Membranprotein ist keinen Detergenzien ausgesetzt, wodurch das Risiko einer Denaturierung minimiert wird.

1.3 BAKTERIORHODOPSIN

1.3.1 *Halobacterium salinarum*

Bakteriorhodopsin (bR) ist in der Purpurmembran des extrem halophilen, obligat aeroben Archaeons *Halobacterium salinarum* lokalisiert. Extrem halophile *Archaea* kommen in salzhaltigen Lebensräumen wie Salzseen oder auf der Oberfläche stark gesalzener Lebensmittel wie Fleisch oder Fisch vor. Zur Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks pumpen *Archaea* der Gattung *Halobacterium* große Mengen K^+ aus der Umgebung in die Zelle, sodass die K^+ -Konzentration innerhalb der Zelle höher ist als die Na^+ -Konzentration außerhalb der Zelle. Die Zusammensetzung der

Zellmembran von *Archaea* unterscheidet sich von der anderer Organismen. Statt Fettsäuren als Seitenketten der Lipide bestehen diese bei *Archaea* aus sich wiederholenden Isopreneinheiten, welche über Etherbindungen mit Glycerin verbunden sind. Dieser Membran liegt eine Zellwand aus Glycoproteinen auf, die durch Na^+ stabilisiert wird. Die cytoplasmatischen Proteine von *Halobacterium* sind stark sauer und weisen einen geringen Anteil an hydrophoben Aminosäuren auf, um ein Präzipitieren bei den hohen Salzkonzentrationen zu vermeiden (Madigan *et al.*, 2006; Fukuchi *et al.*, 2003).

1.3.2 Die Funktionsweise von Bakteriorhodopsin

Halobacterium salinarum bildet bei geringen Sauerstoffkonzentrationen bR, welches als lichtgetriebene Protonenpumpe zur ATP-Synthese beiträgt, und lagert es in der Zellmembran ein. Es entstehen inselförmige Membranbereiche, die aus der Lipidmatrix und in hexagonaler-kristalliner Anordnung eingelagerten bR-Molekülen bestehen. Aufgrund der tiefpurpurnen Farbe des bR werden diese Membranfraktionen als Purpurmembran bezeichnet (Sumper *et al.*, 1976). bR besteht aus sieben α -helikalen Transmembrandomänen, welche als Helix A bis G bezeichnet werden, und besitzt Retinal als Kofaktor, das über eine protonierte Schiff'sche Base an das Lysin an Position 216 in Helix G kovalent gekoppelt ist (Abb. 4) und dem bR die Purpurfärbung verleiht. Die Helices sind kreisförmig in der Membran angeordnet. Das Retinal unterteilt das Protein in eine hydrophobe cytoplasmatische Seite und eine hydrophile extrazelluläre Seite. Sichtbares Licht im grünen Bereich des Spektrums (500 nm – 650 nm) wird von bR absorbiert und führt zu einer Isomerisierung des Retinals von der *all-trans* in die *13-cis* Konfiguration. Ein Proton wird daraufhin in Richtung der extrazellulären Seite von der Schiff'schen Base auf das Aspartat an Position 85 übertragen, welches die Freisetzung eines anderen Protons auf der extrazellulären Oberfläche des Proteins zur Folge hat. Die Schiff'sche Base ändert anschließend zur Reprotonierung ihre Zugänglichkeit von extrazellulär zu intrazellulär. Die Reprotonierung der Schiff'schen Base erfolgt von der cytoplasmatischen Seite aus über das Aspartat an Position 96 (Abb. 4). Das Retinal wird thermisch reisoomerisiert und ist wieder für die extrazelluläre Seite zugänglich. Dieser Photozyklus geht mit einer Reihe von Zwischenstufen des Proteins einher, die absorptionsspektroskopisch unterschieden und als I, J, K, L, M₁, M₂, N und O bezeichnet werden (Haupts *et al.*, 1999; Lanyi, 2006). Die Freisetzung des Protons in die extrazelluläre Umgebung erfolgt beim Übergang von Stadium L nach M und die Aufnahme des Protons zwischen Stadium N und O. Durch das Pumpen von Protonen an die äußere Oberfläche der

Membran baut sich eine protonenmotorische Kraft auf, die eine ATPase zur Synthese von ATP antreibt.

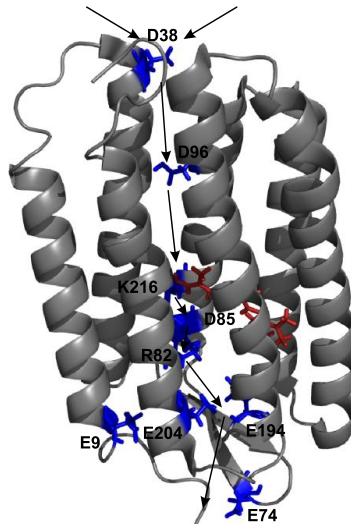


Abb. 4 Strukturmodell von bR (PDB: 1R2N). Aminosäuren, die beim Protonentransport eine Rolle spielen, und die Ausrichtung ihrer Seitenketten sind blau markiert. Eingelagertes Retinal ist rot angezeigt. Der mögliche Pfad des Protonentransfers ist durch Pfeile angezeigt und bezieht sich auf Haupts *et al.*, 1999. Die Visualisierung der bR-Struktur erfolgte über das Programm pymol.

1.3.3 Bakteriorhodopsin als Modell eines integralen Membranproteins

bR gilt als Modellsystem für ein polytopisches Transmembranprotein und wurde mittels zahlreicher biophysikalischer und spektroskopischer Methoden untersucht. Dazu gehören unter anderem Strukturuntersuchungen über NMR (Katragadda *et al.*, 2001), Kristallographie (Pebay-Peyroula *et al.*, 1997) und Elektronenmikroskopie (Grigorieff *et al.*, 1996) und spektroskopische Untersuchungen wie UV-Vis-Spektroskopie (Wang *et al.*, 2002), Fourier-Transformationsinfrarotspektroskopie (Le Courte *et al.*, 1995) und Fluoreszenzspektroskopie (Kim *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass sich korrekt gefaltetes bR in großen Mengen aus *Halobacterium salinarum* isolieren lässt (Oesterhelt *et al.*, 1974) und dass seine Aktivität leicht spektroskopisch nachweisbar ist (siehe Kapitel 2.2.3.3), hat bR zu einem der am besten untersuchten Membranproteine gemacht.

Da in bR genau wie in GPCRs sieben Transmembranhelices einen Ring formen, diente bR lange Zeit als strukturelles Modell für GPCRs. Die Einlagerung von Retinal als Kofaktor erinnert stark an Rhodopsin, dem Sehpigment im Auge. Rhodopsin stellt

gewissermaßen eine Verbindung zwischen bR und GPCRs dar, da es zum einen wie bR Retinal bindet und zum anderen wie GPCRs mit einem G-Protein gekoppelt ist. Generell scheint die Ringbildung aus sieben Transmembranhelices einen Einsatz in Signaltransduktion und Ionentransport zu begünstigen, denn Proteine mit sieben Transmembranhelices sind in einer Vielzahl von Organismen wie Archaeobakterien, Viren, Hefen und höheren Eukaryoten zu finden. Die Strukturaufklärung von bR und später auch von Rhodopsin führte zu einem besseren Verständnis von Struktur, Ligandenbindung und Funktion von GPCRs (Bikker *et al.*, 1998).

1.3.4 Bakteriorhodopsin in Nanodiscs

Der Einbau von bR in Nanodiscs wurde zum ersten Mal von Bayburt *et al.* (Bayburt und Sligar 2003; Bayburt *et al.*, 2006) beschrieben. Dabei wurde bR aus der Purpurmembranen von *Halobacterium salinarum* gewonnen, mit Triton solubilisiert und mit MSP, dem Lipid Dimyristoylglycerophosphocholin (DMPC) und dem Detergens Natriumcholat gemischt. Nach Entfernung der Detergenzien wurden die bR beladenen Nanodiscs über Größenausschlusschromatographie isoliert und mittels Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen. Durch Variation des molaren Verhältnisses der einzelnen Komponenten konnte bR entweder in monomerer oder in trimerer Form in die Nanodiscs eingebaut werden. Der Oligomerisierungszustand von bR wurde über charakteristische Peaks im Circular dichroismus nachgewiesen (Bayburt *et al.*, 2006). Trimere Formen von bR werden nur dann gebildet, wenn die Gerüstproteine MSP1E2 und MSP1E3, die Nanodiscs von 10,7 nm bzw. 12,1 nm Durchmesser formen (Denisov *et al.*, 2004), eingesetzt werden. Nanodiscs mit MSP1 als Gerüstprotein können zwar mehrere bR-Moleküle aufnehmen, diese formen allerdings keine geordneten Trimere (Bayburt *et al.*, 2006). Die Funktionsfähigkeit des bR in Nanodiscs wurde anhand des charakteristischen Absorptionsmaximums (~ 550 nm) und über Titrationen mit *all-trans* Retinal überprüft. (Bayburt und Sligar, 2003).

bR kann auch zellfrei exprimiert und mit Detergenzien aus Präzipitaten solubilisiert werden. Das solubilisierte bR kann dann zur Assemblierung von bR beladenen Nanodiscs nach der Methode von Bayburt und Sligar verwendet werden (Etzkorn *et al.*, 2013). Ein direkter Einbau von bR in Nanodiscs während der zellfreien Expression ist ebenfalls möglich und wurde bereits in Kapitel 1.2.3. beschrieben.

1.4 PHAGENDISPLAY

Phagendisplay beschreibt die Präsentation von fremden Proteinen oder Peptiden auf der Oberfläche von Bakteriophagen (Smith, 1985). Mit Hilfe von *in vitro* Selektionen können aus Phagenbibliotheken Protein- oder Peptidvarianten isoliert werden, die bestimmte Eigenschaften wie z. B. die Bindung an ein Zielprotein aufweisen. Die Präsentation des fremden Proteins oder Peptids auf der Phagenoberfläche wird erreicht, indem die entsprechende kodierende DNA-Sequenz mit dem Gen für eines der Hüllproteine des Phagen fusioniert wird. Dadurch entsteht eine direkte Verbindung zwischen Phänotyp und Genotyp.

1.4.1 Morphologie und Lebenszyklus filamentöser Phagen

Als Bakteriophagen (kurz: Phagen) bezeichnet man Viren, die Bakterien infizieren. Sie stellen aufgrund ihres einfachen genetischen und strukturellen Aufbaus und der simplen Kultivierung im bakteriellen Wirt wichtige Werkzeuge in der Gentechnik dar. Durch den Einsatz von Phagengenomen als Vektoren können Phagen zum Einschleusen fremder DNA in Bakterien genutzt werden.

Filamentöse Phagen weisen eine helikale Geometrie auf und ihr Genom besteht aus einzelsträngiger DNA. Der Phage M13 stellt ein Modellsystem für filamentöse Phagen dar. Der Phage hat einen Durchmesser von 6 nm und eine Länge von 860 nm. Die Phagenpartikel bestehen aus fünf Hüllproteinen. Die einzelsträngige DNA wird von tausenden Kopien des Hüllproteins pVIII umgeben, welche sich überlappen und im 20°-Winkel von der Partikelachse absteigen, sodass sie eine rechtsdrehende Helix formen (Marvin 1998) (Abb. 5). An dem einen Ende des Phagenpartikels befinden sich ungefähr jeweils fünf Kopien der Hüllproteine pVII und pIX, während jeweils circa fünf Kopien der Proteine pIII und pIV an dem anderen Ende des Phagenpartikels zu finden sind. Das Hüllprotein pIII wird häufig für das Phagendisplay eingesetzt. Die N-terminale Domäne von pIII, welche für die Infektion verantwortlich ist, bildet kleine noppenartige Strukturen, welche in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu sehen sind. pIII besteht aus drei Domänen, die als N1, N2 und N3 bezeichnet werden und durch lange, flexible und glycinreiche Linker verbunden sind (Clackson und Lowman, 2004).

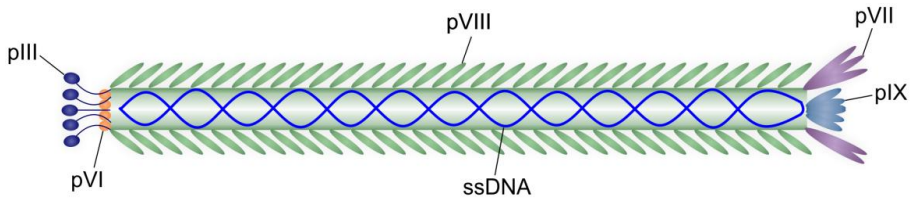


Abb. 5 Schematischer Aufbau des filamentösen M13-Phagen. Tausende Kopien des Haupthüllproteins pVIII umgeben die zirkuläre einzelsträngige DNA (ssDNA) des Phagengenoms. Die Hüllproteine pIII, pVI, pVII und pIX kommen in ca. fünf Kopien am proximalen und distalen Ende des Phagen vor. Der Phage ist fast 150-mal so lang wie breit.

Filamentöse Phagen infizieren gram-negative Bakterien über den F-Pilus, welcher auf dem F-Plasmid der Bakterien kodiert liegt und während der Konjugation für den Kontakt zwischen Donorzelle (F^+ , Hfr) und Rezipientenzelle (F^-) verantwortlich ist. Zellen ohne F-Plasmid (F^-) werden von filamentösen Phagen mit extrem verminderter Effizienz infiziert (Russel *et al.*, 1988). Die Interaktion mit der N2-Domäne von pIII mit dem äußeren Ende des F-Pilus führt zu einer Depolymerisierung der Pilinuntereinheiten des F-Pilus und zu einer Annäherung des Phagen in Richtung der inneren Membran. Die N1-Domäne von pIII interagiert daraufhin mit dem TolA-Rezeptor des Bakteriums (Deng *et al.*, 1999). Der genaue Mechanismus der Aufnahme der viralen DNA in das Cytoplasma ist noch unbekannt. Der TolQRA-Komplex des Wirtes wird für die Depolymerisierung der Phagenhüllproteine und der Translokation der DNA in die Zelle benötigt (Sidhu, 2005; Kay *et al.*, 1996).

Innerhalb der Bakterienzelle wird die einzelsträngige Phagen-DNA in die doppelsträngige, replikative Form (RF-Plasmid) umgewandelt. Das RF-Plasmid dient als Template für das Ablesen der Phagengene, welches zur Bildung von neuen Phagenbestandteilen führt. Die Bildung des einzelsträngigen Virengenoms erfolgt vom RF-Plasmid aus über Rolling-circle-Replikation. Das Verpacken der einzelsträngigen DNA in die Phagenpartikel findet an der Zellmembran statt. Auch alle Hüllproteine werden zunächst in die Zellmembran integriert. Das Protein pIV formt dabei eine Pore, in der die negativ-geladene DNA über den positiv-geladenen N-Terminus des Proteins festgehalten wird. Das Hüllprotein pVIII und die anderen Hüllproteine lagern sich in der Pore um die DNA an, während das Protein pIII erst beim Export an die Phagenpartikel geheftet wird. Vor der Phagenassemblierung wird die Pore durch die Proteine pI und pXI verschlossen gehalten, um eine Zellyse zu verhindern. Verlässt der reife Phage die Pore, wird diese erneut verschlossen, bis mit der Assemblierung des nächsten Phagen begonnen wird (Slonczewski und Foster, 2011).

1.4.2 Das Prinzip von Phagendisplayselektionen

Außer dem M13-Phagen werden die Phagen λ , T4 und T7 für Phagendisplay eingesetzt, da diese Phagen die Aufnahme von fremder DNA in ihr Genom tolerieren. Beim M13-Phagen kann die Präsentation des Proteins entweder über den Phagenvektor, welcher die komplette Genomsequenz des Phagen enthält, oder über Plasmid-basierte Phagemide, die nur das Fusionsprotein kodieren, erfolgen. Die fremde DNA-Sequenz wird im Phagenvektor mit der eines der Hüllproteine fusioniert, was dazu führt, dass alle Kopien des Hüllproteins in den Phagen, die nach der Transformation der Bakterienzelle mit diesem Phagenvektor gebildet wurden, mit dem fremden Protein fusioniert sind. Das Phagemid dagegen ist ein kleines Plasmid, das nur das fusionierte Hüllprotein kodiert. Um Phagen zu erzeugen, die dieses tragen, müssen die Bakterienzellen zusätzlich mit einem Helferphagen infiziert werden. Die daraus resultierenden Phagen besitzen sowohl Hüllproteine, die mit dem zu präsentierenden Protein fusioniert sind, als auch das Wildtyphüllprotein. Beim M13-Phagen erfolgt die Fusion des fremden Polypeptids üblicherweise an das Hüllprotein pIII oder pVIII. Über das pVIII, dem Haupthüllprotein des Phagen, können nur kurze Peptidsequenzen von 6 bis 7 Aminosäuren präsentiert werden, da sonst die Phagenassemblierung behindert wird. Die Präsentation dieser Peptidsequenzen erfolgt dafür aber in tausendfacher Ausführung. pIII kommt in fünf Kopien am proximalen Ende des Virions vor und wird am häufigsten für Phagendisplayfusionen verwendet, da es Insertionen von größeren Fragmenten erlaubt (Clackson und Lowman, 2004).

Die Herstellung von Peptidbibliotheken auf der Oberfläche von Phagen erfolgt durch die Klonierung von randomisierten DNA-Sequenzen in das Leseraster eines der Hüllproteingene. Solche Phagenbibliotheken bestehen aus einer Vielzahl von Phagenklonen, von dem jeder eine andere Variante des Peptids präsentiert. Peptide, die spezifisch an bestimmte Proteine binden, können über *in vitro* Selektionen aus diesem Pool von Peptidvarianten isoliert werden (Abb. 6). Das Zielprotein wird auf eine feste Oberfläche immobilisiert und mit der Phagenbibliothek inkubiert. Ungebundene Phagen werden durch stringentes Waschen eliminiert und gebundene Phagen durch geeignete Elutionsbedingungen eluiert. Die eluierten Phagen werden durch Infektion von Bakterienzellen amplifiziert und für die nächste Selektionsrunde eingesetzt. Die Durchführung mehrerer Selektionsrunden erlaubt die Selektion von Peptidvarianten, die sich unter den gewählten Selektionsbedingungen gegenüber anderen Peptidvarianten durchsetzen, indem sie beispielsweise eine höhere Affinität zum Zielprotein zeigen. Dadurch dass die Peptide auf den Phagen präsentiert werden, kann

durch Sequenzierung der DNA der isolierten Phagen das Peptid ermittelt werden, das an das Zielprotein bindet.

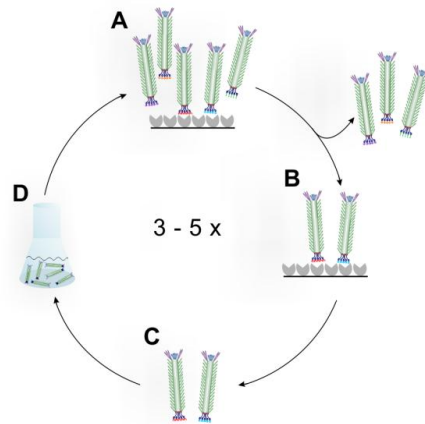


Abb. 6 Prinzip einer Phagendisplayselektion. Die Phagenbibliothek wird mit dem immobilisierten Zielprotein inkubiert (A). Ungebundene Phagen werden gewaschen (B). An das Zielprotein gebundene Phagen werden eluiert (C) und in einer *E. coli*-Kultur amplifiziert (D), um für weitere Selektionsrunden eingesetzt zu werden.

1.4.3 Anwendungen von Phagendisplay

Phagendisplay wird für zahlreiche Anwendungen genutzt (Bratkovic, 2010). Dazu gehören die Epitopkartierung von Antikörpern (Rowley *et al.*, 2004), das Screening von Rezeptoren gegen Agonisten oder Antagonisten (Schooltink und Rose-John, 2005), die Entwicklung und Reifung von Antikörpern (Hoogenboom, 2002), das Finden von Enzymsubstraten oder -inhibitoren (Deperthes, 2002; Hawinkels *et al.*, 2007), die Identifizierung von gekoppelten Proteinen, die Analyse von Protein-Protein Interaktionen (Sidhu und Koide, 2007), die Entwicklung von Enzymen mit neuartigen Spezifitäten (Fernandez-Gacio *et al.*, 2003), die Entwicklung von Impfstoffen (De Berardinis und Haigwood, 2004) und die Erhöhung der Stabilität von Proteinen (Jung *et al.*, 1999). Die Suche nach Liganden gegen ein Zielprotein kann bei der Entwicklung von Pharmazeutika und Diagnostika von Bedeutung sein. Beispielsweise können Peptide, die aus Peptidbibliotheken isoliert wurden, an das aktive Zentrum oder an allosterische Bindetaschen des Proteins binden und somit die Aktivität des Zielproteins *in vitro* und *in vivo* verändern.

1.4.4 Phagendisplay und Membranproteine

Da die Mehrheit der Pharmazeutika durch die Interaktion mit Membranrezeptoren (siehe Kapitel 1.1.2.) wirken, kann das Screening von Phagenbibliotheken gegen Membranrezeptoren zur Isolierung neuartiger pharmakologisch aktiver Substanzen führen.

Die Anwendung von Phagendisplay auf Membranproteine ist jedoch eine Herausforderung, da Membranproteine die Integration in eine Membrenumgebung benötigen. Oft werden daher nur lösliche Teile eines Rezeptors, wie z. B. die extrazelluläre Domäne, als Zielproteine eingesetzt (Vrieling *et al.*, 2010). Bei GPCRs allerdings weist die extrazelluläre Domäne eine komplexe Struktur aus N-Terminus, Teilen der sieben Transmembranhelices und drei der Loops auf, sodass sie nicht als eigenständige Domäne exprimiert und gereinigt werden kann. Daher ist die Integration des gesamten Proteins in die Membran entscheidend für die Bildung von Bindungsepitopen.

Es gibt vereinzelte Beispiele, in denen ganze Membranproteine als Zielproteine für Phagendisplay verwendet wurden. Dazu gehört das env-Glykoprotein aus HIV, einem integralen Membranprotein mit einem Transmembrandurchgang, welches mit Detergenzien aus Zellen solubilisiert und in Vesikel rekonstituiert wurde. Eine Antikörper-basierte Phagenbibliothek, die Fab-Fragmente präsentiert, wurde verwendet, um Antikörper gegen dieses Protein zu selektieren (Labrijn *et al.*, 2002). Der Rezeptor CCR5, ein GPCR, wurde in eine Lipiddoppelschicht auf der Oberfläche von paramagnetischen Kügelchen mit Hilfe eines Antikörpers immobilisiert. Ein Teil der Lipide war biotinyliert, um diese über konjugiertes Streptavidin auf den Magnetkügelchen festzuhalten. Der Antikörper erlaubte die Immobilisierung des Rezeptors in eine definierte Richtung. Mit Hilfe dieser paramagnetischen Proteoliposomen konnte eine Phagenbibliothek nach Antikörperfragmenten gegen den Rezeptor durchsucht werden (Mirzabekov *et al.*, 2000). Ganze Zellen, die ein Membranprotein stabil exprimieren, können ebenfalls für Phagendisplayselektionen eingesetzt werden (Wang *et al.*, 2006). Dies hat den Vorteil, dass das Membranprotein nicht erst isoliert werden muss und dass die native Struktur des Proteins gewährleistet ist. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass Phagen, die an andere Membranproteine der Zelle binden, ebenfalls selektiert werden. Eine Negativselektion der Bibliothek mit Zellen, die das gewünschte Zielprotein nicht exprimieren, kann helfen die Selektion von unspezifischen Phagen zu reduzieren. Hauptsächlich werden Krebszelllinien für Phagendisplayselektion verwendet, um Peptide gegen krebsspezifische Rezeptoren zu isolieren (Dong *et al.*, 2008). Ein weiterer Nachteil

dieser Methode besteht darin, dass hauptsächlich Liganden identifiziert werden, die an extrazelluläre Regionen des Rezeptors binden. Die Isolierung von intrazellulär bindenden Peptiden kann aber zum Transport von therapeutischen Substanzen in das Zellinnere ebenfalls erwünscht sein und setzt die Aufnahme der Phagen in die Zelle voraus (Zhu *et al.*, 2008). *In vivo* Selektionen stellen auch eine Möglichkeit dar, Liganden gegen Membranproteine zu isolieren, vor allem wenn es primär darum geht, Peptide zu finden, die gegen spezielle Zellen gerichtet sind (Arap *et al.*, 2002).

Membranproteine wurden aber nicht nur als Zielproteine im Phagendisplay in Betracht gezogen, sondern auch auf der Oberfläche von Phagen präsentiert und so für Bindungsstudien oder funktionelle Untersuchungen genutzt (Olszewski *et al.*, 2004; Morrison und Weiss, 2001). Die erfolgreiche Präsentation von funktionalen Membranproteinen konnte für periphere, monotopische und β -Barrel-Proteine gezeigt werden, jedoch nicht für α -helikale Transmembranproteine (Vithayathil *et al.*, 2011).

1.5 ZIEL DIESER ARBEIT

Membranproteine sind die größte Klasse von Zielmolekülen für pharmakologische Wirkstoffe. Die Selektion von Liganden aus großen Bibliotheken mit Hilfe von Phagendisplayselektionen bildet einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Medikamente. Der Einsatz von integralen Membranproteinen für das Phagendisplay gelang in der Vergangenheit allerdings nur durch komplizierte und auf das jeweilige Membranprotein spezialisierte Ansätze. Der Grund für die eingeschränkte Nutzung dieser Proteine liegt in der starken Hydrophobizität der Transmembranbereiche, die die Expression und Reinigung von funktionalem Protein erschweren. Eine Membrenumgebung ist notwendig, damit integrale Membranproteine in Lösung bleiben, sich korrekt falten und native Epitopbildung zeigen.

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung eines allgemein anwendbaren Ansatzes zur Nutzung von Membranproteinen als Zielproteine für Phagendisplayselektionen. Am Beispiel eines integralen polytopischen Membranproteins sollten aus einer Peptidbibliothek, die auf Phagen präsentiert wurde, Liganden gegen dieses Protein isoliert werden. Es sollten Nanodiscs als Modellmembranen verwendet werden, um dem Membranprotein eine Membrenumgebung zu bieten. Nanodiscs erschienen als geeignet für die Durchführung von Phagendisplayselektionen, da sie sehr stabil sind, das Membranprotein von beiden Membranseiten zugänglich machen und auf festen Oberflächen immobilisiert werden können. Das α -helikale polytopische Transmembranprotein Bakteriorhodopsin (bR) aus *Halobacterium salinarum* sollte das Zielprotein für die Selektion sein. bR wurde ausgewählt, da es bereits sehr gut

charakterisiert ist und aufgrund seiner sieben Transmembranhelices starke Ähnlichkeiten zu GPCRs aufweist, der größten Zielgruppe für pharmakologische Wirkstoffe. Weiterhin sollten die Bindungsstellen der selektierten Liganden untersucht werden und nachgewiesen werden, dass die Liganden an diskontinuierliche Epitope des bR binden, die aufgrund der Integration des Proteins in die Membran geformt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Bakterienstämme

Bakterienstämme, die zur Expression von Proteinen, zur Klonierung und Amplifikation von DNA und zur Anzucht von Phagen verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Genotypen und Referenzen der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_Bm_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_Bm_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]</i>	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> OmniMAX™ 2 T1R	F' { <i>proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10</i> (Tet ^R) Δ(<i>ccdAB</i>)} <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> ER2738	F' <i>proA⁺B⁺ lacI^R Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10</i> (Tet ^R)/ <i>fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>E. coli</i> Mach1	Δ <i>recA1398 endA1 tonA Φ80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR</i> (r _K ⁻ m _K ⁺)	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt. Plasmid-DNA wurde in 5 mM Tris-HCl pH 8,5 bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2: Resistenzen, Beschreibungen und Referenzen der verwendeten Plasmide

Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Bezugsquelle
pEXP5-CT/TOPO [®]	Ampicillin	PT7, His-Tag, TOPO-Klonierungsstelle, pUC origin	Invitrogen, Carlsbad, USA
pEXP5-CT/bR	Ampicillin	pEXP5-CT/TOPO [®] mit <i>bR</i> -Insert (Bakteriorhodopsin GenBank accession no. J02755)	Invitrogen, Carlsbad, USA
pEXP-CT/bR-TCG	Ampicillin	pEXP5-CT/bR mit Stop839S Mutation	Diese Arbeit
pET28a	Kanamycin	PT7, His-Tag, <i>lacI</i> , pBR322 origin, f1 origin, multiple Klonierungsstelle	Novagen, Darmstadt, Deutschland
pET28-MSP1	Kanamycin	pET28 mit <i>his-msp1</i> -Insert	ICS-6, Forschungszentrum Jülich, Jülich, Deutschland
pMALC2	Ampicillin	Ptac, <i>lacI</i> , pBR322 origin, f1 origin, Maltosebindeprotein	New England Biolabs, Ipswich, USA
pRK793	Ampicillin	pMALC2 mit <i>His-TEV(S219V)-Arg5</i> -Insert; Plasmid #8827	Addgene, Rockville, USA

2.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ (Berlin, Deutschland) bezogen und als 50 µM Lösung in H₂O bei -20 °C gelagert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Oligonukleotide, die zur Klonierung und Sequenzierung eingesetzt wurden

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
bR mut_f	CGG CCG CTA CCT CTT CGA AGG GTC ATC ATC AC
bR mut_r	GTG ATG ATG ACC CTT CGA AGA GGT AGC GGC CG
T7-Promotor	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7-Terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
M13 -96 gpIII	CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG

2.1.4 Antikörper, Enzyme und Peptide

Es wurden folgende Antikörper in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper

Bezeichnung (Katalognummer)	Antigen	Konjugat	Bezugsquelle
HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate (27-9421-01)	M13 gp8	HRP	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Anti-Apolipoprotein A-I Polyclonal Antibody (PA1-28965)	Humanes Apolipoprotein A-I	HRP	Thermo Scientific, Waltham, USA
Penta-His Antibody, BSA-free (34660)	5xHis	-	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Goat Anti-mouse IgG (H+L) Secondary Antibody (31430)	Maus IgG	HRP	Thermo Scientific, Waltham, USA
Donkey Anti-goat IgG HRP (sc-2020)	Ziege IgG	HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und anderen Proteine sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Enzyme und anderen Proteine

Enzym	Bezugsquelle
DNAse 1	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Lysozym	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fyn-SH3	ICS-6, Forschungszentrum Jülich, Jülich, Deutschland

Peptide, welche extramembrane Bereiche von bR darstellen, sind in Tabelle 6 aufgelistet. Das Protein besitzt sieben Transmembranhelices, welche als A bis G bezeichnet werden. Die Loops dazwischen werden nach einer Kombination aus den benachbarten Transmembranhelices benannt. Beispielsweise wird der Loop zwischen Helix A und B als Loop AB bezeichnet. Die Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies (Berlin, Deutschland) mit einem Reinheitsgrad >90 % synthetisiert. Die Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies biotinyliert, um eine Kopplung an Streptavidin-beschichtete Platten zu erzielen. Ttds ((N-(3-{2-[2-(3-Aminopropoxy)-ethoxy]-ethoxy}-propyl)-succinamic acid) diente als Abstandshalter, um sterische Behinderung zu reduzieren. Alle Peptide wurden C-terminal amidiert. Das Peptid „N-terminus“ wurde zusätzlich N-terminal acetyliert.

Tabelle 6: Liste der Peptide, welche extramembrane Bereiche von bR darstellen

Bezeichnung	Sequenz
N-Terminus	Acetyl-QAQITGRPEW-Ttds-Lys(Biotin)NH ₂
Loop AB	Biotin-Ttds-KGMGVSDPDAKKFY-NH ₂
Loop AB zyklisiert	Biotin-Ttds-CKGMGVSDPDAKKFYC-NH ₂
Loop BC	Biotin-Ttds-GYGLTMVPFGGEQNPI-NH ₂
Loop BC zyklisiert	Biotin-Ttds-CGYGLTMVPFGGEQNPIC-NH ₂
Loop CD	Biotin-Ttds-LALLVDADQGT-NH ₂
Loop CD zyklisiert	Biotin-Ttds-CLALLVDADQGTC-NH ₂
Loop DE	Biotin-Ttds-TKVYSYR-NH ₂
Loop DE zyklisiert	Biotin-Ttds-CTKVYSYRC-NH ₂
Loop EF	Biotin-Ttds-GFTSKAESMRPEVASTFK-NH ₂
Loop EF zyklisiert	Biotin-Ttds-CGFTSKAESMRPEVASTFKC-NH ₂
Loop FG	Biotin-Ttds-GSEGAGIVPLNI-NH ₂
Loop FG zyklisiert	Biotin-Ttds-CGSEGAGIVPLNIC-NH ₂
C-Terminus	Biotin-Ttds-LRSRAIFGEAEPEPSAGDGAAATS-NH ₂

2.1.5 Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen Kits sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Liste der kommerziell erworbenen Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
Expressway Cell-Free <i>E. coli</i> Expression System	Invitrogen, Carlsbad, USA
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
NucleoBond PC 20	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoBond PC 100	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Ph.D. TM -12 Phage Display Peptide Library	New England Biolabs, Ipswich, England
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA
LMW und HMW Gel Filtration Calibration Kit	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
EZ-Link NHS-PEG4 Biotinylation Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.6 Nährmedien, Puffer und andere Lösungen

In den Tabellen 8 bis 16 sind die verwendeten Nährmedien, Puffer und Lösungen aufgelistet. Nährmedien wurden in deionisiertem Wasser, Puffer und Lösungen in zweifach-deionisiertem Wasser angesetzt.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium (Lysogenic Broth)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
LB-Festmedium:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 20g/l Agar
SOC-Medium:	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 0,19 g/l KCl, 20 g/l Glucose, 10 mM MgCl ₂

Tabelle 9: Liste allgemein verwendeter Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4
PBS-T	PBS mit 0,05 % Tween 20
TBS	25 mM Tris-HCl, 0,9 % NaCl, pH 7,4
TBS-T	TBS mit 0,1 % Tween 20

Tabelle 10: Lösungen für das Phagendisplay

Bezeichnung	Zusammensetzung
IPTG/X-Gal- Stammlösung	1,25 g IPTG, 1 g X-Gal in 25 ml DMSO
LB-Tet-IPTG/X-Gal- Festmedium	LB-Festmedium, 20 mg/ml Tetrazyklin, 1 ml IPTG/X-Gal- Stammlösung
Top-Agar	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 1 g/l MgCl ₂ , 7 g/l Agarose
Blockierungspuffer	10 mg/ml BSA in TBS-T
Elutionspuffer	0,2 M Glycin-HCl, pH 2,2
Neutralisierungspuffer	1 M Tris-HCl, pH 9,1
PEG/NaCl-Lösung	20 % (w/v) Polyethylenglycol-8000, 2,5 M NaCl
3M-NaAc:TE-Puffer	9:1 Mischung aus 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8

Tabelle 11: Lösungen für Puffer und Gele für die SDS-PAGE

Bezeichnung	Zusammensetzung
Sammelgel (5 %)	4,85 % (w/v) Acrylamid 0,15 % (w/v) N,N'-Methyldisacrylamid 125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (v/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
Trenngel (12 %)	11,64 % (w/v) Acrylamid 0,36 % (w/v) N,N'-Methyldisacrylamid 375 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (v/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
Trenngel (15 %)	14,55 % (w/v) Acrylamid 0,45 % (w/v) N,N'-Methyldisacrylamid 375 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (v/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
4 x Probenpuffer	200 mM Tris-HCl pH 7,4 40 % (v/v) Glycerin 8 % (w/v) SDS 0,05 (w/v) Bromphenolblau 8 % β -Mercaptoethanol
SDS-Laufpuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,3 385 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Coomassie-Färbelösung	25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250

Tabelle 12: Lösungen für Western Blot-Experimente

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anodenpuffer 1	300 mM Tris-HCl, 10% Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer 2	25 mM Tris-HCl, 10% Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer	25 mM Tris-HCl, 40 mM Glycin, pH 9,4
Blockierungspuffer	10% fetales Kälberserum in TBS-T oder 3 % BSA in TBS-T

Tabelle 13: Lösungen zur Reinigung der TEV-Protease

Bezeichnung	Zusammensetzung
TEV-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol
TEV-Elutionspuffer I	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 10 % Glycerin, 100 mM Imidazol
TEV-Elutionspuffer II	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 10 % Glycerin, 300 mM Imidazol
TEV-Elutionspuffer III	20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 10 % Glycerin, 750 mM Imidazol
TEV-Laufpuffer	25 mM Natriumphosphat pH 8, 200 mM NaCl, 10 % Glycerin, 2 mM EDTA, 10 mM DTT
TEV-Lagerungspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM NaCl, 10 % Glycerin, 0,5 mM EDTA, 2 mM DTT

Tabelle 14: Lösungen zur Reinigung von MSP1

Bezeichnung	Zusammensetzung
MSP1-Lysepuffer	20 mM Natriumphosphat pH 7,4, Roche Proteaseinhibitor, 1 % Triton, 100 µg/ml Lysozym, DNase I
MSP1-Waschpuffer I	40 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1 % Triton
MSP1-Waschpuffer II	40 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 50 mM Natriumcholat
MSP1-Waschpuffer III	40 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl,
MSP1-Waschpuffer IV	40 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
MSP1-Elutionspuffer I	40 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol
MSP1-Elutionspuffer II	40 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 750 mM Imidazol
TEV-Spaltungspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT
Ni-NTA Batch Puffer	20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 50 mM Natriumcholat
Ni-NTA Batch Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 50 mM Natriumcholat, 750 mM Imidazol

Tabelle 15: Lösungen zur Assemblierung von Nanodiscs

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lipidpuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM Natriumcholat
Assemblierungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA
Nanodisc-Laufpuffer	10 mM Natriumphosphat pH 7,4, 150 mM NaCl

Tabelle 16: Lösungen zur Reinigung von bR-beladenen Nanodiscs

Bezeichnung	Zusammensetzung
bR-Waschpuffer I	50 mM Natriumphosphat pH 8, 500 mM NaCl
bR-Waschpuffer II	50 mM Natriumphosphat pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol
bR-Elutionspuffer I	50 mM Natriumphosphat pH 8, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol
bR-Elutionspuffer II	50 mM Natriumphosphat pH 8, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol

2.1.7 Größenmarker

Folgende Größenmarker wurden für die SDS-PAGE verwendet. Alle Größenmarker stammten von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA.

Tabelle 17: Liste der verwendeten Größenmarker

Marker	Größen
Unstained Protein Molecular Weight Marker	116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4; 14,4 kDa
PageRuler Prestained Protein Ladder	170; 130; 100; 70; 55; 40; 35; 25; 15; 10 kDa

2.1.8 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad pro analysi oder höher. Chemikalien, die nicht in Tabelle 18 aufgeführt sind, wurden in der Regel von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und Sigma Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Tabelle 18: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Biobeads SM-Adsorbent	Biorad, München, Deutschland
Complete Proteaseinhibitortabletten	Roche, Basel, Schweiz
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Thermo Scientific, Waltham, USA
1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ni-NTA Säulenmaterial	QIAGEN, Hilden, Deutschland

2.1.9 Geräte und sonstige Materialien

In Tabelle 19 sind Geräte aufgelistet, die bei der Durchführung der Experimente zum Einsatz gekommen sind.

Tabelle 19: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
ÄKTA purifier	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Amicon Filtrationskammer	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
GelDoc2000	Biorad, München, Deutschland
GelDoc MP	Biorad, München, Deutschland
HiLoad 16/600 Superdex 200 pg	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
HiLoad 26/60 Superdex 75 pg	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
JA 25.50 Rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
JLA 8.100 Rotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Lyophile Alpha 1-4	Christ, Osterode am Harz, Deutschland
Minischüttler PSU-2T	Biosan, Riga, Lettland
Multitron Pro Inkubationsschüttler	Infors-HT, Bottmingen, Schweiz
Nanophotometer P300	Implen, München, Deutschland
pH-Meter	Mettler TOLEDO, Greifensee, Schweiz
POLARstar OPTIMA	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
Polyacrylamid-Gelelektrophoreseapparatur	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
SE 260	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler iCycler	Biorad, München, Deutschland
Ultraschallgenerator Branson 250 mit Mikrospritze	Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA
Unitron Inkubationsschüttler	Infors-HT, Bottmingen, Schweiz
UV-Vis Spektrometer Lambda 25	Perkin Elmer, Waltham, USA
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5702R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman Coulter, Brea, USA

Sonstige Materialien, die für Experimente benötigt wurden, sind in Tabelle 20 aufgelistet. Nicht aufgelistete Materialien entsprachen den üblichen Laborstandards.

Tabelle 20: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Nunc Immobilizer Amino Mikrotiterplatten	Thermo Scientific, Waltham, USA
Nunc Immobilizer Streptavidin Mikrotiterplatten	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ni-NTA HisSorb Strips Mikrotiterplatten	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Spectra/Pro Dialyseschlauch	Spectrumlabs, Los Angeles, USA
Vivaspin 2 Zentrifugalkonzentrator	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Centriprep Zentrifugen-Filtereinheiten	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

2.1.10 Software

Folgende Software wurde in dieser Arbeit eingesetzt.

Tabelle 21: Liste der verwendeten Software

Programm	Hersteller
Clone Manager 9 Professional Edition	Scientific & Educational Software, Cary, USA
Clustal OMEGA	The EMBL-European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK
CorelDRAW X6	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Origin 8.5G	OriginLab Corporation, Northampton, USA
POLARstar OPTIMA Version 2.00	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
Protein Calculator v3.3	The Scripps Research Institute, La Jolla, USA
Quantity One Version 4.4.0	Biorad, München, Deutschland
SAROTUP ("scanner and reporter of target-unrelated peptides")	HLAB Center of Bioinformatics, Chengdu, China
Unicorn 5.0	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Pymol	Schrödinger LLC, South San Francisco, USA

2.2 METHODEN

2.2.1 Gentechnische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Kulturen wurden entweder aus einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder aus einer Glycerinkultur in LB-Flüssigmedium angeimpft. Verfügte der *E. coli*-Stamm über eine Resistenz, wurde die Kultur unter Antibiotikaselektion angezogen. Die Kulturen wurden im Erlenmeyerkolben mit Schikanen über Nacht bei 37 °C und 160 rpm im Inkubationsschüttler geschüttelt. Für Phagenamplifikationen wurden *E. coli*-ER2738-Kulturen verwendet, welche immer von einer frisch ausgestrichenen LB/Tet-Platte angezogen und über Tag inkubiert wurden. Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurde 1 ml Übernachtskultur abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml 20 % Glycerin aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits (Tabelle 7) nach Herstellerangaben isoliert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte dabei nach dem Prinzip der modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Dabei führt nach der Zellyse ein stark alkalischer pH-Wert zur Denaturierung von genomischer und Plasmid-DNA. Ein definiertes Absenken des pH-Wertes bewirkt die Renaturierung der Plasmid-DNA, während die genomische DNA zusammen mit Proteinen ausfällt und abzentrifugiert werden kann. Durch Anionen-Austauschchromatographie über die in den Kits enthaltenden Säulen kann dann hochreine Plasmid-DNA gewonnen werden. Die DNA wurde in 5 mM Tris-HCl pH 8,5 aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.3 Transformation von *E. coli*

Um die Transformation von *E. coli*-Zellen zu ermöglichen, müssen diese zunächst Kompetenz zur Aufnahme von Plasmid-DNA erlangen. Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte durch CaCl_2 -Behandlung nach Cohen *et al.* 1972. Zu diesem Zweck wurden 100 ml LB-Flüssigmedium mit 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} im Bereich von 0,5 – 0,8 im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 160 rpm angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 7000 x g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 10 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach Resuspendieren des Pellets in 20 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 7000 x g wurde der Überstand vorsichtig

abgegossen, das Pellet in 5 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zu je 2,5 ml Zellsuspension wurden 469 μl einer eiskalten 80%igen Glycerinlösung zugegeben und vorsichtig vermischt. Die Zellsuspension wurde in 200 μl -Aliquote auf vorgekühlte Eppendorfgefäße verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C .

Zur Transformation der *E. coli*-Zellen wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Es wurden 100 ng Plasmid-DNA zu den aufgetauten Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C und nach kurzer Inkubation auf Eis die Zugabe von 1 ml LB. Zur Expression der Antibiotikaresistenzgene wurden die Zellen für 30-60 Minuten bei 37°C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Jeweils 100 μl und 900 μl der Zellsuspension wurden auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.4 Charakterisierung von DNA-Molekülen

2.2.1.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe eines Nanophotometers bestimmt. Dieses bestimmt die DNA-Konzentration anhand der Absorption bei 260 nm (A_{260}). Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1 in einer Küvette mit 1 cm optische Weglänge einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, bei einzelsträngiger DNA 37 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Da Proteine über die aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm absorbieren, gibt das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} Aufschluss über den Reinheitsgrad der DNA. Bei reiner DNA sollte dieses bei 1,8 liegen. Ist das Verhältnis kleiner 1,8 liegt eine Proteinverunreinigung vor. Ist das Verhältnis größer als 1,8 deutet dies auf RNA-Rückstände hin.

2.2.1.4.2 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchsynthese von Sanger (Sanger und Coulson, 1975). Über einen Sequenzierprimer und eine DNA-Polymerase wird in vier getrennten Reaktionen einer der komplementären DNA-Stränge verlängert. Zusätzlich zu den Desoxynukleotiden aller vier Basen wird für pro Reaktion jeweils eine Base als Didesoxynukleotid zugegeben. Da dem Didesoxynukleotid die 3'-Hydroxyl-Gruppe fehlt, führt dessen Einbau in die wachsende DNA-Kette zum Abbruch der Synthese. So entstehen DNA-Fragmente verschiedener Längen, die in jedem Ansatz mit der gleichen Base

enden. Eine elektrophoretische Auftrennung der vier Reaktionsansätze gibt Aufschluss über die Sequenz des DNA-Templates. Häufig werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide mit unterschiedlichen Farbstoffen für jede Base verwendet. Dies ermöglicht die Durchführung der Sequenzierung in einem Reaktionsansatz. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt mittels Kapillarelektrophorese und die Fluoreszenz wird über einen Laser angeregt. Die Abfolge der Signale, die am Detektor erscheint, gibt die Sequenz wieder.

Für die Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA wurden pro Reaktion 600 – 700 ng DNA und 20 pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 7 µl benötigt. Bei einzelsträngiger Phagen-DNA wurden 300 – 400 ng DNA und 20 pmol Primer in einem Gesamtvolumen von 7 µl pro Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte über das Programm Clone Manager 9 Professional Edition.

2.2.1.5 Ortsspezifische Mutagenese

Für das Einführen von Mutationen in Plasmid-DNA wurde das „QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ verwendet. Die Durchführung der Mutagenese erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers. Ein komplementäres Primerpaar, welches mittig die gewünschte Mutation trägt, wurde dazu verwendet das gesamte Plasmid, das mutiert werden soll, mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) zu amplifizieren. Das amplifizierte Plasmid trug nun die gewünschte Mutation. Die parentale Plasmid-DNA konnte mit dem Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut werden, da *DpnI* ausschließlich methylierte und semi-methylierte DNA schneidet. Danach wurden kompetente Mach1-Zellen (siehe Kapitel 2.2.1.3 für kompetente Zellen) mit der amplifizierten Plasmid-DNA nach Herstellerprotokoll transformiert und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Fünf Einzelklone wurden über Nacht in jeweils 5 ml LB-Flüssigmedium unter Antibiotikaselektion angezogen. Anschließend wurde mit dem „NucleoBond PC20“ Kit Plasmid-DNA isoliert und wie in Kapitel 2.2.1.4.3 beschrieben sequenziert.

2.2.2 Methoden der Proteinbiochemie

2.2.2.1 Heterologe Proteinexpression in *E. coli* und Proteinreinigung

2.2.2.1.1 Expression und Reinigung von MSP1

E. coli BL21 (DE3) wurde als Expressionsstamm für das Gerüstprotein MSP1-Fusionsprotein verwendet, welches auf dem Expressionsplasmid pET28-MSP1 kodiert ist. Nach Transformation des Expressionsstammes mit dem Expressionsplasmid wurde

aus einer Einzelkolonie über Nacht eine Vorkultur in LB mit 50 µg/ml Kanamycin angezogen. Diese Vorkultur wurde verwendet um 4 x 1 l LB mit 25 µg/ml Kanamycin in einem Verhältnis von 1:100 in anzuimpfen. Die so entstandenen Expressionskulturen wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 inkubiert und dann mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Nach 4 – 5 Stunden Expression bei 37 °C wurden die Zellen für 20 Minuten bei 5000 x g und 10 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet aus je einem Liter Expressionskultur wurde in 20 ml LB resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellpellets wurden bis zur Proteinreinigung bei -20 °C gelagert.

Die Puffer, welche für die Reinigung von MSP1 benötigt wurden, sind in Tabelle 14 aufgelistet. Für die Reinigung wurden Zellpellets aus 4 l Expressionskultur verwendet.

Das Zellpellet aus einem Liter Expressionskultur wurde dafür in jeweils 10 ml MSP1-Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Ultraschallstab aufgeschlossen und das Lysat für eine Stunde auf dem Rollschüttler inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 50000 x g und 10 °C für 30 Minuten pelletiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte über den His-Tag des Fusionsproteins mittels einer Metalaffinitätschelachromatographie (englisch: immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC), welche auf der Affinität von Histidin zu zweiwertigem Nickel beruht. Dazu wurde der Überstand aus der Zentrifugation auf Ni-NTA-Säulenmaterial gegeben, welches zuvor mit Lysepuffer ohne Lysozym, DNase I und Triton äquilibriert worden war, und für 30 Minuten inkubiert. Die Säule wurde mit jeweils vier Säulenvolumina MSP1-Waschpuffer 1 – 4 gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte durch jeweils vier Säulenvolumina MSP1-Elutionspuffer 1 und 2. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf einem 15%igen Gel (siehe Kapitel 2.2.2.2) analysiert. Fraktionen, welche das MSP1 beinhalteten, wurden gegen 1 l TEV-Spaltungspuffer dialysiert. Die Abspaltung des N-terminalen His-Tags erfolgte durch die TEV-Protease im Dialyseschlauch (MWCO: 3500 Da) für 48 – 60 Stunden. Dabei wurde auf 10 mg MSP1 1 mg TEV-Protease (Kapitel 2.2.2.1.2) gegeben und der Dialyseschlauch in 4 l Spaltungspuffer überführt. Die Abtrennung des abgespaltenen His-Tags und der Protease erfolgte über eine Ni-NTA-Säule. Die durch die Protease gespaltenen Komponenten wurden dafür zunächst gegen Ni-NTA Batch Puffer ohne Natriumcholat dialysiert. Anschließend wurde der Ansatz auf eine Endkonzentration von 50 mM Natriumcholat eingestellt und mit 13 ml Ni-NTA-Säulenmaterial für eine Stunde inkubiert. Die Säule wurde mit 2 x zwei Säulenvolumina Ni-NTA Batch Puffer gewaschen. Das gespaltene MSP1 befand sich im Durchfluss und in der ersten Waschfraktion. Die Elution der Protease und des His-Tags erfolgte mit 3 x einem Säulenvolumen Ni-NTA Batch Elutionspuffer. Fraktionen mit gespaltenem MSP1 wurden vereint und gegen Nanodisc-Assemblierungspuffer (Tabelle 15) dialysiert. Das

Protein wurde über Centriprep Zentrifugen-Filtereinheiten (MWCO: 3500 Da) auf 1,5 – 2,5 mg/ml konzentriert, lyophilisiert und bei -80 °C gelagert. Für die Konzentrationsbestimmung wurde ein theoretischer Extinktionskoeffizient bei A_{280} von $\epsilon = 23950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt. Das Molekulargewicht beträgt 23329,3 Da.

2.2.2.1.2 Expression und Reinigung der TEV-Protease

Zur Abspaltung des His-Tags vom MSP1 wurde die Tobacco Etch Virus (TEV)-Protease mit der Mutation S219V verwendet (Kapust *et al.*, 2001). Der Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL wurde mit dem Expressionsplasmid pRK793 transformiert. Eine Übernachtskultur, welche aus einem Einzelklon in LB mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol angezogen worden war, diente zum Animpfen von 2 x 1 l Expressionskultur. Die Expressionskultur wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit der Vorkultur beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,6 – 0,8 angezogen. Nach Induktion der Proteinexpression mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG wurde für 4 Stunden bei 30 °C exprimiert. Die Expressionskultur wurde mittels Zentrifugation pelletiert (20 Minuten bei 5000 x g), das Pellet mit PBS gewaschen und bei -20 °C bis zur Weiterbehandlung gelagert.

In Tabelle 13 sind die Puffer aufgeführt, die zur Reinigung der TEV-Protease benötigt wurden. Die Zellpellets wurden in 30 ml TEV-Lysepuffer resuspendiert und die Zellen wurden durch Sonifizieren lysiert. Nachdem Polyethyleneimin zu einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) hinzugefügt wurde, wurde das Zellysat für 30 Minuten bei 50000 x g und 10 °C zentrifugiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte über IMAC, indem der Überstand auf eine Säule, welche mit 10 ml äquilibrierter Ni-NTA gepackt war, geladen wurde. Nach dem Auftragen wurden die Säule mit 15 Säulenvolumina TEV-Lysepuffer gewaschen und die TEV-Protease mit einem Säulenvolumen TEV-Elutionspuffer I, 3 x einem Säulenvolumen TEV-Elutionspuffer II und einem Säulenvolumen TEV-Elutionspuffer III eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden in eisgekühlte Gefäße aufgefangen und sofort mit 1 mM EDTA und 1 mM DTT versetzt. Nach einer SDS-PAGE auf einem 15%igen Gel (siehe Kapitel 2.2.2.2) wurden TEV-enthaltene Fraktionen vereint und das Gesamtvolumen mit der Amicon Filtrationskammer (MWCO: 10000 Da) auf 10 ml eingeeengt. Zur weiteren Reinigung wurde eine Größenausschlusschromatographie über eine HiLoad 26/60 Superdex 75 µg Säule mit einer Flussrate von 1,5 ml/min und TEV-Laufpuffer durchgeführt. Vor dem Auftragen auf die Säule wurde die Proteinlösung über einen Spritzenfilter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. Fraktionen, welche TEV enthielten, wurden gegen den TEV-Lagerungspuffer dialysiert und zur Lagerung bei -80 °C mit 20 % Glycerin

versetzt. Für die Konzentrationsbestimmung wurde ein Extinktionskoeffizient bei A_{280} von $\varepsilon = 32220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und ein Molekulargewicht von 28617.5 Da ermittelt.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (1970). Es wurden Gele mit 12%igem oder 15%igem Trenngel und 5%igem Sammelgel verwendet (Tabelle 11). Die Proteine wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Probenpuffer (Tabelle 11) versetzt und auf 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Das Erhitzen der Probe und das Reduktionsmittel (β -Mercaptoethanol) im Probenpuffer führen zum Aufbrechen von Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen im Gel. Das anionische Detergens SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine, was zu einer negativen Gesamtladung der Proteine führt und ihre Trennung im elektrischen Feld anhand ihrer Größe erlaubt. Mit Hilfe von Molekulargewichtsmarkern (Tabelle 17) wurde das Molekulargewicht der untersuchten Proteine abgeschätzt. Die Elektrophorese wurde pro Gel bei 40 mA für 45 Minuten durchgeführt. Zur Detektion der Proteine wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung für 30 Minuten im Wasserbad gefärbt und zum Entfärben in Wasser aufgekocht. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe des GelDoc MP System.

2.2.2.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Proteinen wurde am UV-Vis-Spektrometer anhand der Absorption von ultravioletter Strahlung bei einer Wellenlänge von 280 nm (A_{280}) durch das Protein bestimmt. Diese Art der Konzentrationsbestimmung ist möglich, da Tryptophan und Tyrosin und in geringem Maße auch Phenylalanin ultraviolettes Licht absorbieren. Der Berechnung der Konzentration liegt das Lambert-Beer'sche Gesetz zugrunde:

$$c = \frac{A_{280}}{d \cdot \varepsilon_{280}}$$

c = Konzentration (M)

A_{280} = gemessene Absorption bei 280 nm

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

ε = molarer Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei 280 nm

Der Extinktion liegen die physikalischen Prozesse der Streuung und Absorption zugrunde. Da verdünnte Lösungen gemessen werden, kann der Anteil der Streuung vernachlässigt werden. Der Extinktionskoeffizient von Proteinen setzt sich zusammen aus den theoretischen Extinktionskoeffizienten der aromatischen Aminosäuren. Der

theoretische, molare Extinktionskoeffizient wurde über das Programm Protein Calculator v3.3 (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>) ermittelt.

2.2.3 Herstellung von Nanodiscs

2.2.3.1 Herstellung leerer Nanodiscs

Zur Herstellung einer MSP1-Stocklösung in Assemblierungspuffer (1,5 – 2,5 mg/ml) wurde lyophilisiertes MSP1 in das ursprüngliche Volumen Wasser aufgenommen. Für analytische Ansätze wurde je Ansatz 0,5 mg MSP1 eingesetzt, für präparative Ansätze 10 mg bis 30 mg je Ansatz. Die MSP1-Stocklösung wurde mit einer Lipidlösung bestehend aus 50 mM 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) in Lipidpuffer (Tabelle 15) in einem molaren Verhältnis von MSP1 zu DMPC von 1:70 vermischt. Zu Testzwecken wurde das molare Verhältnis zwischen MSP1 und DMPC variiert. Das Verhältnis zwischen DMPC und Natriumcholat betrug 1:2. Der Ansatz wurde abwechselnd für jeweils 20 Minuten bei 4 °C und 25 °C inkubiert. Insgesamt wurde dreimal bei 4 °C und zweimal bei 25 °C inkubiert. Die Entfernung des Natriumcholats, welche die Assemblierung der Nanodiscs einleitet, konnte durch zwei Methoden erreicht werden. Zum einen wurden Biobeads verwendet, welche Detergenzien mit hoher Affinität adsorbieren. Zum anderen konnte das Detergens durch Dialyse entfernt werden. Für die Verwendung von Biobeads wurden pro Milliliter Assemblierungslösung 0,65 g Biobeads, welche mit Assemblierungspuffer gewaschen wurden, verwendet und bei Raumtemperatur für 4 Stunden inkubiert. Zum Entfernen der Biobeads wurde die Lösung über einen Spritzenfilter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. Bei der Dialysemethode wurde die Assemblierungslösung für 16 Stunden gegen dreimal 0,5 l Assemblierungspuffer bei 10 °C dialysiert (MWCO: 1000 Da). Die Analyse der Assemblierungslösungen und Reinigung der Nanodiscs erfolgte an einem ÄKTapurifier System. Die Elution von Proteinen wurde über UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 214 nm und 280 nm nachgewiesen. Lipide konnten bei einer Wellenlänge von 214 nm auch detektiert werden. Für analytische Läufe wurde die Superdex 200 10/300 GL Säule (Flussrate: 0,5 – 0,6 ml/min) verwendet, präparative Läufe fanden an der HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule (Flussrate: 1 ml/min) statt. Zur Kalibrierung der Säulen wurden die globulären Proteine Thyroglobulin (MW: 669 kDa), Ferritin (MW: 440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa) aus den LMW und den HMW Kalibrierungskits (Tabelle 7) verwendet. Das Ausschlussvolumen der Säulen wurde mittels Blue Dextran (MW: ~ 2000 kDa) bestimmt.

Nanodiscs aus präparativen Ansätzen wurden nach der Größenausschlusschromatographie über Centriprep Zentrifugen-Filtereinheiten und Vivaspin 2 Zentrifugalkonzentratoren (MWCO: 10 000 Da) bei sehr geringen Drehzahlen (600 bis 1200 x g) bis zu einer Konzentration von 200 – 250 μM konzentriert. Da Nanodiscs aus zwei Kopien MSP1 und Lipiden, die nicht bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren, bestehen, wurde für die Bestimmung der Konzentration ein Extinktionskoeffizient, welcher zweimal dem von MSP1 entspricht ($\epsilon = 2 \times 23950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 47900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), und ein Molekulargewicht von 150 kDa angenommen.

2.2.3.2 Beladung von Nanodiscs mit Bakteriorhodopsin über zellfreie Proteinsynthese

bR wurde über zellfreie Proteinsynthese exprimiert und kotranslational in Nanodiscs eingebaut. Katzen *et al.* (2008) konnten zeigen, dass in Gegenwart leerer, vorgeformter Nanodiscs zu zellfreien Proteinsynthesereaktionen bR in Nanodiscs eingebaut werden kann. Für die Durchführung der zellfreien Proteinsynthese wurde das Expressway Cell-Free *E. coli* Expression System verwendet. Als DNA-Template diente das Plasmid pEXP5-CT/bR-TCG. Die Plasmid-DNA wurde vor dem Einsatz in der zellfreien Proteinsynthese über das Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ nach Herstellerangaben gereinigt, um Verunreinigungen, die die Proteinsynthese stören könnten, zu entfernen. Es wurden zunächst folgende Komponenten zusammengefügt:

<i>E. coli</i> slyD ⁻ Extrakt	200 μl
2,5 x IVPS Reaktionspuffer	200 μl
50 mM Aminosäuren (-Met)	12,5 μl
75 mM Methionin	10 μl
Nanodiscs	1,35 mg
T7 Enzymmix	10 μl
pEXP5-CT/bR-TCG	10 μg
H ₂ O	bis zu 500 μl

Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten im Thermomixer bei 1200 rpm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurden folgende vorgemischten Komponenten hinzugefügt.

2,5 x IVPS Feeding Puffer	200 µl
50 mM Aminosäuren (-Met)	12,5 µl
75 mM Methionin	10 µl
10 mM all-trans Retinal	5 µl
H ₂ O	bis zu 500 µl

Die Expression wurde für 2 Stunden bei 37 °C und 1200 rpm fortgeführt. Nach der Expression wurde der Ansatz bei 15000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1,5 ml Ni-NTA Säulenmaterial, welches zuvor mit bR-Waschpuffer I äquilibriert worden war, 30 Minuten lang inkubiert. Die Säule wurde dann mit jeweils zwei Säulenvolumina bR-Waschpuffer I und bR-Waschpuffer II gewaschen. Das Protein wurde eluiert durch 4 x einem Säulenvolumen bR-Elutionspuffer I und 2 x zwei Säulenvolumina bR-Elutionspuffer II. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 16 aufgeführt. Die unterschiedlichen Reinigungsfractionen wurden über SDS-PAGE auf 12%igen Gelen analysiert. Fractionen aus der Gesamtreaktion, dem Überstand, dem Pellet, dem Durchlauf und der ersten Waschfractionen wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Aceton gefällt. Dafür wurde das aufzutragende Volumen mit dem vierfachen Volumen an Aceton gemischt und 5 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 x Probenpuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 80 °C erwärmt. Elutionsfractionen, die bR und MSP1 enthielten, wurden vereint und auf eine äquilibrierte HiLoad 16/600 Superdex 200 pg Säule geladen. Die Größenausschlusschromatographie wurde bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit dem Nanodiscs Laufpuffer (Tabelle 15) durchgeführt. Es wurden die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm, 214 nm und 550 nm aufgenommen, da bR ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 550 nm aufweist. Fractionen mit bR-beladenen Nanodiscs wurden vereint. Homogenität und Stabilität der bR-beladenen Nanodiscs wurden vor weiteren Experimenten über analytische Größenausschlusschromatographie mittels einer Superdex 200 10/300 GL (Flussrate: 0,5 ml/min) überprüft.

2.2.3.3 Nachweis der korrekten Faltung von Bakteriorhodopsin in Nanodiscs

Die kovalente Bindung des Kofaktors Retinal an das Lys216 über eine protonierte Schiff'sche Base verleiht dem bR ein Absorptionsmaximum (λ_{max}) bei ~ 550 nm. Dieses Absorptionsmaximum dient als Nachweis für die korrekte Faltung von bR. bR durchläuft während des Photozyklus eine Reihe von spektroskopisch unterscheidbaren Zwischenformen, welche mit der Isomerisierung von *all-trans* zu *13-cis* Retinal und dessen Reisomerisierung einhergehen. Die Isomerkomposition des Retinals ist abhängig vom Zustand des bR. Im dunkeladaptierten Zustand beispielsweise ist der

Anteil des *all-trans* Retinals geringer und der des *13-cis* Retinals höher (Wang *et al.*, 2002). Anhand charakteristischer Absorptionsmaxima im Absorptionsspektrum von bR lassen sie Monomere und Trimere im licht- und dunkeladaptierten Zustand unterscheiden (Tabelle 23).

Absorptionsspektren von bR wurden bei Wellenlängen von 400 nm bis 700 nm in 100 µl Einmalküvetten am UV-Vis-Spektrometer aufgenommen.

Tabelle 23: Absorptionsmaxima (λ_{\max}) von trimerem und monomerem bR im licht- und dunkeladaptierten Zustand bei Raumtemperatur. Tabelle wurde angepasst aus Wang *et al.* (2002).

Zustand	λ_{\max}
Trimer, lichtadaptiert	568 nm
Trimer, dunkeladaptiert	558 nm
Monomer, lichtadaptiert	553 nm
Monomer, dunkeladaptiert	546 nm

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteingemische gelelektrophoretische aufgetrennt, auf eine Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion mittels Antikörper unterzogen, die spezifisch für das analysierte Protein sind (Renart *et al.* 1979).

Der Proteintransfer fand in einer Semi-Dry-Blot-Apparatur auf eine PVDF-Membran statt. Die Puffer, die für den Proteintransfer und den Antikörperrnachweis benötigt wurden, sind in Tabelle 9 und 12 aufgeführt. Das Proteingel wurde nach der SDS-PAGE für 1 Stunde in Kathodenpuffer inkubiert. Die Membran wurde kurz vor dem Transfer für 5 Minuten mit Methanol aktiviert. Drei in Anodenpuffer I geschwenkte Filterpapiere wurden auf die Anode der Semi-Dry-Blot-Apparatur platziert gefolgt von drei in Anodenpuffer II getränkten Filterpapieren. Die Membran wurde mit Anodenpuffer II gewaschen und auf die Filterpapiere gestapelt. Anschließend wurde das Proteingel vorsichtig auf die Membran gelegt und mit drei weiteren Filterpapieren, die in Kathodenpuffer geschwenkt wurden, bedeckt. Der Transfer erfolgte bei 100 mA und 25 V für 30 Minuten. Die Membran wurde nach dem Transfer für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und für 30 Minuten mit Blockierungspuffer abgesättigt. Die Membran wurde dann mit dem ersten Antikörper in entsprechender Verdünnung über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T für jeweils 5

Minuten wurde der zweite HRP-gekoppelte Antikörper hinzugefügt und für eine Stunde inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBS-T für jeweils 5 Minuten gewaschen. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte über Chemilumineszenz mit Hilfe des „SuperSignal West Pico Chemiluminescent“ Substrats an der GelDoc MP.

2.2.4.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ein ELISA wurde verwendet, um die Kopplung von beladenen und unbeladenen Nanodiscs auf Mikrotiterplatten nachzuweisen. Als ELISA wird ein Nachweisverfahren bezeichnet, in dem über Antikörper die Anwesenheit eines Antigens auf einer festen Oberfläche, wie einer Mikrotiterplatte, nachgewiesen wird (Engvall *et al.*, 1971; Van Weemen und Schuurs, 1971).

Zum Nachweis der Nanodiscs diente ein HRP-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Apolipoprotein A-I. Die Nanodiscs wurden in verschiedenen Konzentrationen in einem Volumen von 100 µl in PBS in Wells verschiedener 96-Well Platten gegeben und über Nacht unter leichtem Schütteln bei 8 °C inkubiert.

Bei Verwendung von „Ni-NTA HisSorb Strips“ Mikrotiterplatten wurden die Wells nach der Immobilisierung viermal mit PBS-T für jeweils 30 Sekunden gewaschen und anschließend mit dem Antikörper in einer 1:4000 Verdünnung in PBS für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Detektion wurden die Wells erneut viermal mit PBS-T gewaschen. Zum Herstellen der Detektionslösung wurde eine Tablette des Chromogens 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in 1 ml DMSO gelöst und mit 9 ml 50 mM Phosphatcitratpuffer vermischt. Die Detektion erfolgte mit 100 µl der Detektionslösung. Die auftretende Farbreaktion wurde mit 100 µl 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Farbintensität mit dem Fluostar Optima Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 450 nm quantifiziert.

Bei Verwendung von „Nunc Immobilizer Amino“ Mikrotiterplatten wurden die Wells nach der Kopplung dreimal mit PBS-T gewaschen und die Oberfläche mit 100 mM Ethanolamin in 100 mM Natriumcarbonatpuffer pH 9,6 für eine Stunde deaktiviert. Anschließend wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und der Antikörper in einer 1:4000 Verdünnung für vier Stunden inkubiert. Es wurde nochmal dreimal mit PBS-T gewaschen und anschließend wie oben beschrieben detektiert.

2.2.5 Phagendisplay

Das Phagendisplay ist eine effektive Methode, um Peptide zu selektieren, die spezifisch und hoch affin an ein bestimmtes Zielprotein binden. Randomisierte Peptide werden dabei auf der Oberfläche von Phagen präsentiert, indem sie wie z. B. in der hier verwendeten Bibliothek mit dem Hüllprotein pIII fusioniert werden. In dieser Arbeit

wurde die kommerzielle Bibliothek Ph.D.-12 verwendet, welche aus $2,7 \times 10^9$ verschiedenen M13-Phagenklonen besteht und 12-mer Peptide präsentiert. Als Zielprotein diente bR inkorporiert in Nanodiscs.

2.2.5.1 Durchführung der Selektionsrunden

bR-beladene Nanodiscs (10 µg/ml) wurden wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben auf „Nunc Immobilizer Amino“ Mikrotiterplatten gekoppelt. Nach Deaktivierung der Plattenoberfläche mit Ethanolamin wurde dreimal mit PBS-T gewaschen. Bei Selektion 1 wurde direkt mit der Inkubation der Phagenbibliothek fortgefahren, während bei Selektion 2 die Plattenoberfläche vor der Inkubation mit der Phagenbibliothek mit 300 µl Blockierungslösung (siehe Tabelle 10 für Lösungen zum Phagendisplay) für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert wurde. Bei Selektion 2 wurde das Well vor der ersten Selektionsrunde sechsmal mit TBS-T gewaschen. Für die erste Selektionsrunde wurden 10 µl der Ph.D.-12 Phagenbibliothek mit 100 µl TBS gemischt und in das gekoppelte Well für 20 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln gegeben. Das Well wurde dann zehnmal mit TBS-T gewaschen, um nicht gebundene Phagen zu eliminieren. Phagen, die an das Zielprotein gebunden haben, wurden mit 0,2 M Glycin pH 2,2 eluiert, indem das Well für 10 Minuten mit 100 µl dieser Lösung inkubiert wurde. Die Phagenlösung wurde dem Well entnommen und mit 25 µl 1 M Tris-HCl pH 9,1 neutralisiert. Für spätere Titerbestimmungen (Output-Titer) wurden 5 µl dieser Phagenlösung aufbewahrt, der Rest wurde zu 20 ml einer *E. coli* ER2738-Kultur mit OD₆₀₀ 0,1 gegeben, um die Phagen zu amplifizieren. Die Phagenamplifikation erfolgte für 5 Stunden bei 37 °C im Inkubationsschüttler. Anschließend wurden die Bakterien für 20 Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert und 1 ml des Phagenüberstandes wurde für den Anreicherungs-ELISA aufbewahrt. Der Rest des Phagenüberstandes wurde mit 7 ml PEG/NaCl-Lösung über Nacht auf Eis gefällt.

Nach einstündigem Pelletieren der Phagen bei 5000 x g wurden diese in 1 ml TBS aufgenommen und 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Es folgte eine Fällung der Phagen auf Eis für eine Stunde durch Zugabe von 200 µl PEG/NaCl-Lösung zum Überstand. Anschließend wurden die Phagen für 45 Minuten bei 5000 rpm pelletiert, in 100 µl TBS aufgenommen und davon der Titer (Input-Titer) bestimmt (siehe unten). Insgesamt wurden für jede Selektion vier Selektionsrunden durchgeführt. Für die folgenden Selektionsrunden wurden immer 2×10^{11} Phagen aus der vorherigen Selektionsrunde eingesetzt.

Verdünnungsreihen der Phagen von 10^{-3} bis 10^{-7} dienten zur Bestimmung des Output-Titers und von 10^{-8} und 10^{-13} zur Bestimmung des Input-Titers. Das Ansetzen der Verdünnungsreihen erfolgte in LB-Medium. Es wurden 100 µl der jeweiligen

Verdünnungen mit 100 µl einer *E. coli* ER2738-Kultur OD₆₀₀ 0,6 gemischt und zusammen mit 800 µl Top-Agar auf eine kleine LB-Tet-IPTG/X-Gal-Platte verteilt. Für jede Verdünnungsstufe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden 100 µl LB ohne Phagen mit Bakterien und Topagar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung des Phagentiters erfolgte durch Auszählen der blauen Plaques.

2.2.5.2 Anzucht von Einzelphagen

Zur Untersuchung einzelner Phagenklone mussten diese zunächst amplifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden einzelne Plaques von den Platten der Output-Titerbestimmung gepickt und in je 5 ml *E. coli* ER2738-Kultur, welche zuvor auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt wurde, überführt. Nach fünfstündiger Inkubation der Kulturen bei 37 °C und 160 rpm wurden die Bakterien abzentrifugiert (5000 x g, 20 Minuten) und die Phagenüberstände für weitere Analysen verwendet (Antiphagen-ELISA, DNA-Isolierung etc.). Zur dauerhaften Lagerung bei -20 °C wurden die Phagenüberstände in eine 40 %ige Glycerinlösung überführt.

2.2.5.3 Antiphagen-ELISA

Über den Antiphagen-ELISA kann die Bindung eines einzelnen Phagen oder ganzer Phagengemische an das Zielprotein untersucht werden. Beladene und unbeladene Nanodiscs (10 µg/µl) wurden dafür auf „Nunc Immobilizer Amino“ Mikrotiterplatten gekoppelt (siehe Kapitel 2.2.4.2). Nach der Kopplung wurden die Wells mit Blockierungspuffer blockiert und sechsmal mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Phagenüberstände aus Einzelphagenamplifikationen oder aus Gesamtphagenamplifikationen vor und nach den Selektionsrunden in die Wells gegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit TBS-T wurden gebundene Phagen mit einem HRP-gekoppelten monoklonalen Antikörper, welcher gegen das Hüllprotein pVIII des M13-Phagen gerichtet ist, nachgewiesen. Dafür wurden 200 µl des Antikörpers 1:5000 mit Blockierungspuffer verdünnt und für eine Stunde inkubiert. Die Wells wurden sechsmal mit TBS-T gewaschen und die Signale wurden wie in Kapitel 2.2.4.2 detektiert.

2.2.5.4 Isolierung von Phagen-DNA

Durch Sequenzierung der Phagen-DNA kann die auf der Oberfläche der Phagen präsentierte Peptidsequenz ermittelt werden. Dafür wurde zunächst die DNA aus den Phagen isoliert. Die Isolierung der einzelsträngigen Phagen-DNA erfolgte aus Phagenüberständen. 1,6 ml Phagenüberstand wurde für 10 Minuten bei 5000 rpm

zentrifugiert und der Überstand in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde dann mit 400 µl PEG/NaCl-Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurde 10 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurde erneut für 2-3 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Phagenpellet wurde in 200 µl 3 M-NaAc:TE-Puffer resuspendiert und mit 500 µl Ethanol versetzt. Es folgten 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Nach zehnmündiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde das Pellet mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen, 10 Minuten zentrifugiert und getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 20 µl H₂O aufgenommen. Zur Sequenzierung wurde der Primer M13 -96 gpIII verwendet (Sequenzierung siehe Kapitel 2.2.1.4.3).

2.2.5.5 Epitopkartierung

Eine Epitopkartierung wurde vorgenommen, um die Bindungsstellen der selektierten Phagen an bR vorherzusagen. Zu diesem Zweck wurden Peptide synthetisiert, die den Bereichen von bR entsprechen, die nicht in der Membran eingelagert sind (Tabelle 6). Alle Peptide verfügten über einen Biotinrest, um eine Kopplung an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten zu erreichen. Ein auf PEG basierter Abstandshalter wurde zwischen dem Biotin und der Peptidsequenz eingebaut, um sterische Einschränkungen zu minimieren.

56 pmol der jeweiligen Peptide wurden in 100 µl PBS auf Nunc Immobilizer Streptavidin Mikrotiterplatten über Nacht bei 8 °C gekoppelt. Nach dem Blocken mit Blockierungspuffer für eine Stunde wurden die Wells dreimal mit PBS-T gewaschen. EinzelpHagen wurden aus je 100 µl Phagenüberstand in die Wells gegeben und für 1,5 Stunden inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBS-T wurde der HRP-gekoppelte M13-Antikörper zum Nachweis der Bindung verwendet. Der Antikörper wurde 1:5000 mit Blockierungspuffer verdünnt und 200 µl dieser Lösung wurden in die Wells gegeben. Nach einer Stunde wurden die Wells sechsmal mit PBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.2.

Auf jeder Mikrotiterplatte wurde eine Referenz mitgeführt. Dabei handelte es sich um das Protein Fyn-SH3 und den Phagen Fyn36, welcher ebenfalls über ein Phagendisplay selektiert wurde (Diplomarbeit Julian Glück). Fyn-SH3 wurde über das EZ-Link NHS-PEG4-Biotinylierungskit nach Herstellerangaben biotinyliert und wie die Peptide auf die Nunc Immobilizer Streptavidin Mikrotiterplatte immobilisiert. Der Phage Fyn36 wurde als Phagenüberstand auf das Protein gegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 HERSTELLUNG VON NANODISCS

Nanodiscs sollen als Modellmembran für das bR während der Phagendisplayselektion eingesetzt werden. In diesem Kapitel wird zunächst die Herstellung von leeren Nanodiscs beschrieben. Der Herstellungsprozess wurde im kleinen Maßstab optimiert und dann auf ein größeres Volumen übertragen. Ein Stabilitätstest wurde durchgeführt, um die Stabilität der Nanodiscs in den detergenshaltigen Puffern des Phagendisplays zu untersuchen.

3.1.1 Optimierung der Nanodisc-Herstellung

Für den Einbau von Membranproteinen in Nanodiscs über die zellfreie Proteinsynthese wurden größere Mengen leerer Nanodiscs benötigt. Es war daher eine Optimierung der Nanodisc-Assemblierung notwendig, um eine möglichst effektive Umsetzung des Gerüstproteins (MSP1) und des Lipids in monodisperse Nanodiscs zu erreichen. Besonders wichtig dafür ist das optimale Verhältnis zwischen MSP1, Lipid und Detergens während der Assemblierung, um Lipid-Vesikel, Lipid/MSP1-Aggregationen oder überschüssiges MSP1 zu minimieren.

Zu diesem Zweck wurden Ansätze mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen von MSP1, 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) als Lipid und Natriumcholat als Detergens analysiert. Für jeden Ansatz wurden 0,5 mg MSP1 eingesetzt. Es wurden Verhältnisse zwischen MSP1, DMPC und Natriumcholat von 1:70:140, 1:80:160 und 1:90:180 getestet. Die Methode der Natriumcholatrextraktion kann bei der Bildung der Nanodiscs ebenfalls eine Rolle spielen. Daher wurden zwei Vorgehensweisen zur Entfernung des Detergens aus der Assemblierungslösung untersucht. Es wurden zum einen Biobeads verwendet, welche unpolare oder oberflächenaktive Substanzen wie Detergenzien adsorbieren. Die Entfernung der Detergenzien erfolgte dabei sehr schnell im Verlauf von vier Stunden. Zum anderen konnte Natriumcholat auch über eine Dialyse über einen Zeitraum von 16 Stunden aus dem Ansatz entfernt werden. Anschließend wurden die verschiedenen Assemblierungsansätze mittels Größenausschlusschromatographie untersucht (Abb. 7). Durch Kalibrierung der Säule mit Proteinen bekannter hydrodynamischer Durchmesser konnten den Retentionsvolumina der Assemblierungsansätze Partikelgrößen zugeordnet werden.

In den Größenausschlusschromatogrammen ist die Elution der Partikel in Form von Peaks in Abhängigkeit vom Retentionsvolumen aufgezeichnet. Kleine Partikel diffundieren langsamer durch die Säule, da sie von der porösen Säulenmatrix zurückgehalten werden, und erscheinen im Chromatogramm später als große Partikel, die durch die Zwischenräume der sphärischen Säulenmatrixpartikel diffundieren. Die Visualisierung der Peaks erfolgt durch die Aufnahme von UV-Signalen bei $\lambda = 280 \text{ nm}$. Die Intensität der Peaks gibt Rückschluss auf die Konzentration der eluierten Partikel. Die Größenausschlusschromatogramme der mit Biobeads behandelten Ansätze zeigten ein Muster von zwei und die der dialysierten Ansätze ein Muster von vier Peaks. Die Peaks erschienen meist in kurzen Abständen und waren nicht vollständig voneinander separiert. Bei allen Ansätzen war in den Chromatogrammen der größte Peak bei einem Retentionsvolumen von ungefähr 11 ml zu sehen. Kleine Schwankungen in den Retentionsvolumina zwischen den verschiedenen Ansätzen können durch leicht unterschiedliche Auftragsvolumina zu Stande gekommen sein. In den Ansätzen, in denen das Natriumcholat durch Biobeads entfernt wurde, war ein zweiter Peak bei einem Retentionsvolumen von 9,5 ml zu sehen (Abb. 7a). Die Intensität dieses Peaks war abhängig vom gewählten Verhältnis zwischen MSP1, DMPC und Natriumcholat. Bei zunehmender Menge Lipid im Ansatz nahm die Intensität des Peaks zu. Dieser zweite Peak konnte Partikeln mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 14,9 nm zugeordnet werden. Daher handelte es sich bei diesen Partikeln vermutlich um Aggregate aus MSP1 und Lipid. Die Partikel, welche im Peak bei einem Retentionsvolumen von 11,3 ml eluierten, entsprachen hingegen einem Durchmesser von 10,7 nm bis 10,9 nm. Nach Denisov *et al.* (2004) weisen Nanodiscs, welche mit MSP1 als Gerüstprotein gebildet wurden, einen Durchmesser von 9,7 nm auf. Da Ungenauigkeiten aufgrund von experimentellen Faktoren zustande gekommen sein können, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den Partikeln im Hauptpeak bei 11,3 ml Retentionsvolumen trotz dieser Abweichung um Nanodiscs handeln.

Bei den Ansätzen, die dialysiert wurden, erschien der höchste Peak im Chromatogramm zwischen einem Retentionsvolumen von 11,1 ml und 11,5 ml (Abb. 7b). Dieser wurde mit Partikelgrößen von 10,4 nm für das Verhältnis MSP1:DMPC:Natriumcholat von 1:70:140, 11,2 nm für das Verhältnis 1:80:160 und 11,1 nm für das Verhältnis 1:90:180 in Verbindung gebracht. Somit kommen auch hier die ermittelten Durchmesser denen von Nanodiscs sehr nahe. Im Gegensatz zu den Ansätzen, die mit Biobeads behandelt wurden, war vor dem Nanodisc-Peak lediglich eine Schulter zu sehen. Bei dem Verhältnis 1:70:140 war die Schulter am geringsten und die Größe der Nanodiscs kam den Werten aus der Literatur am nächsten. Bei den

dialysierten Ansätzen erschien im Chromatogramm außerdem ein Peak bei einem Retentionsvolumen von 17,05 ml, der freiem MSP1 zugeordnet wurde.

Das Dialysieren der Assemblierungsansätze zum Entfernen des Detergens schien im Allgemeinen effektiver zu sein als der Einsatz von Biobeads, da weniger höhermolekulare Partikel gebildet wurden. Für die Herstellung von Nanodiscs wurde daher ein Verhältnis zwischen MSP1, Lipid und Natriumcholat von 1:70:140 gewählt und die Extraktion des Natriumcholats mittels Dialyse durchgeführt.

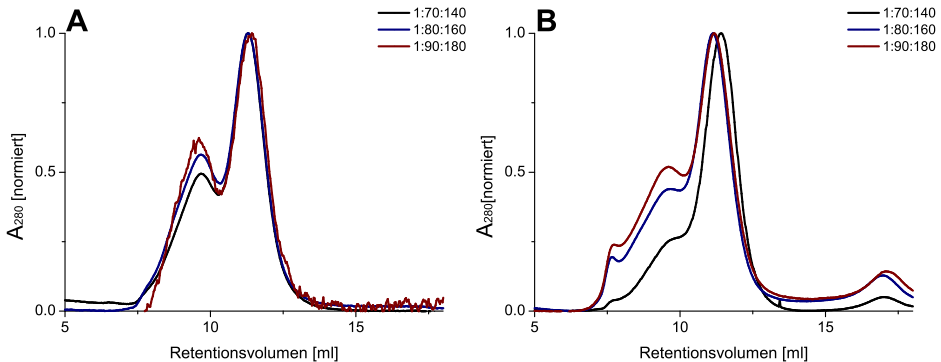


Abb. 7 Größenausschlusschromatogramme von Nanodisc-Testassemblierungen. Es wurden verschiedene Verhältnisse zwischen MSP1, DMPC und Natriumcholat getestet. Natriumcholat wurde aus den Ansätzen über Biobeads (A) oder Dialyse (B) entfernt. Die Analyse der Ansätze erfolgte über eine Superdex 200 10/300 GL Säule bei einer Flussrate von 0,6 ml/min. Zu sehen ist die Aufzeichnung des UV-Signals bei einer Wellenlänge von 280 nm. Nanodiscs eluierten bei einem Retentionsvolumen von ca. 11 ml. Das Ausschlussvolumen der Säule ist bei 8 ml Retentionsvolumen.

3.1.2 Herstellung von Nanodiscs im präparativen Maßstab

Leere Nanodiscs für die zellfreie Proteinsynthese und für Kontrollexperimente wurden im präparativen Maßstab hergestellt. Die Herstellung erfolgte entsprechend des in Kapitel 3.1.1 dargestellten optimierten Herstellungsprozesses. Es wurden im Durchschnitt 10 mg bis 30 mg MSP1 pro Ansatz eingesetzt. Nach der Assemblierung erfolgte die Trennung der Nanodiscs von anderen Komponenten aus dem Assemblierungsansatz über die präparative Größenausschlusschromatographiesäule HiLoad XK16/600 Superdex 200 pg (Abb. 8a). Das Chromatogramm zeigte einen Peak, der bei einem Retentionsvolumen von 95 ml zu sehen war. Anhand der Säulenkalibrierung konnte diesem Retentionsvolumen eine Partikelgröße von 9,7 nm Durchmesser zugeordnet werden. Diese Partikelgröße stimmte genau mit der von Denisov *et al.* (2004) publizierte Größe für Nanodiscs mit MSP1 als Gerüstprotein

überein und bestätigte die erfolgreiche Assemblierung von Nanodiscs. Der Unterschied im hydrodynamischen Durchmesser zwischen dem präparativen Ansatz und dem analytischen Ansatz (10,4 nm) könnte auf Ungenauigkeiten in der Kalibrierung der beiden Säulen zurückzuführen sein.

Es waren nur minimale Mengen an Aggregaten entstanden, welche dem Nanodisc-Peak eine leichte Asymmetrie verliehen. Erwähnenswerte Mengen an freiem MSP waren nicht zu beobachten. Da fast ausschließlich monodisperse Nanodiscs entstanden sind, ließ dies auf eine optimale Wahl der Assemblierungsbedingungen schließen.

Um die für die zellfreie Proteinsynthese benötigten höheren Konzentrationen an Nanodiscs herzustellen, wurden die assemblierten Nanodiscs über Ultrafiltrationskonzentratoren bei geringen Drehzahlen konzentriert, bis Konzentrationen von 200 μ M bis 250 μ M erreicht wurden. Zur Überprüfung der Stabilität der Nanodiscs wurde ein kleiner Teil der konzentrierten Nanodiscs mit Hilfe einer analytischen Größenausschlusschromatographie analysiert (Abb. 8b). Die Nanodiscs eluierten als ein homogener Peak. Das lässt darauf schließen, dass das Konzentrieren weder zur Aggregation noch zum Zerfall der Nanodiscs geführt hat.

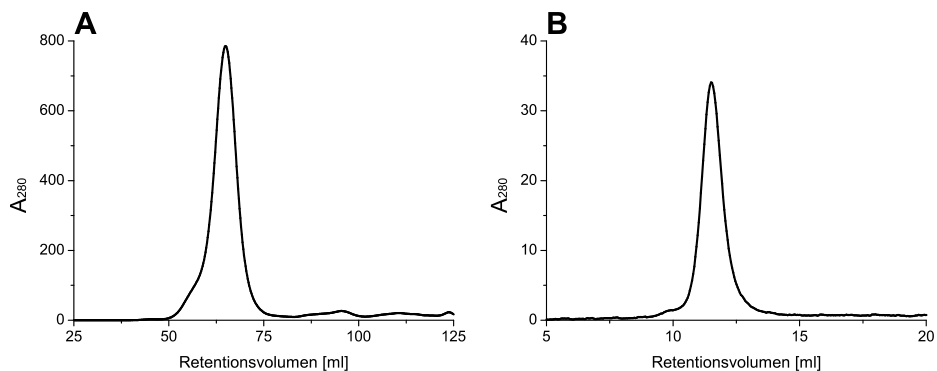


Abb. 8 Größenausschlusschromatogramme einer präparativen Nanodisc-Assemblierung. MSP1 wurde in einem Verhältnis von 1:70:140 mit DMPC und Natriumcholat gemischt. Für die dargestellte Assemblierung wurden 14 mg MSP1 eingesetzt. Nach Dialyse wurde der Ansatz auf eine HiLoad 16/600 Superdex 200 pg geladen (A). Die Flussrate betrug 1 ml/min und die Signale bei $\lambda=280$ nm sind dargestellt. Fraktionen, die Nanodiscs beinhalteten, wurden konzentriert und zur Überprüfung der Qualität über eine Superdex 200 10/300 GL bei einer Flussrate von 0,6 ml/min analysiert (B).

3.1.3 Stabilität von Nanodiscs in Detergens

Da Nanodiscs im Phagendisplay eingesetzt wurden, musste sichergestellt sein, dass diese unter den Pufferbedingungen des Phagendisplays stabil waren. Da der detergentshaltige Puffer TBS-T als Waschpuffer verwendet wurde, musste die Stabilität der Nanodiscs in diesem Puffer untersucht werden, um eine Destabilisierung der Nanodiscs aufgrund des amphiphilen Charakters der Detergenzien ausschließen zu können. Zu diesem Zweck wurden Nanodiscs in dem Waschpuffer TBS-T, der 0,1% des Detergens Tween 20 enthält, für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zur Analyse auf eine Superdex 200 10/300 GL Säule geladen (Abb. 9). Die Analyse zeigte, dass mehr als 75 % der Nanodiscs intakt geblieben waren, während kaum Aggregate und nur geringe Mengen an Abbauprodukten in Form von freiem MSP entstanden waren. Der entstandene MSP-Peak erschien zu einem früheren Retentionsvolumen als der Peak, der in Abb. 7b mit freiem MSP1 in Verbindung gebracht wurde, und ließ auf MSP1 schließen, das eventuell noch Lipidmoleküle gebunden hatte. Insgesamt erschienen die Nanodiscs nach der Behandlung mit Tween 20 zu einem etwas späteren Retentionsvolumen als schmalere Peak als vor der Behandlung. Es wäre denkbar, dass das Detergens einige Lipidmoleküle aus den Nanodiscs gelöst hat, wodurch sich der hydrodynamische Durchmesser leicht verringert hat. Da ein geringerer Durchmesser jedoch zu keinen Einschränkungen in der späteren Nutzung führt und die Menge an entstandenen Nebenprodukten gering war, erschien der Einsatz von 0,1% Tween 20 als unproblematisch.

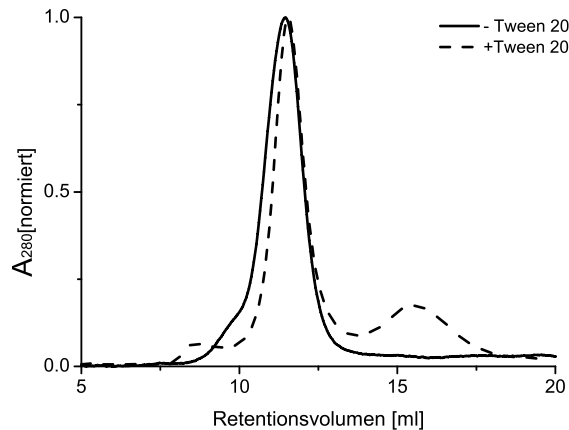


Abb. 9 Stabilität von Nanodiscs im nicht-ionischen Detergens Tween 20. Nanodiscs wurden für 3 Stunden mit 0,1% Tween 20 behandelt und über eine Superdex 200 10/300 GL Säule analysiert. Zum Vergleich wurden unbehandelte Nanodiscs auf die Säule geladen. Der Großteil der Nanodiscs ist nach Detergensbehandlung stabil geblieben. Die Größenausschlusschromatographie wurde bei einer Flussrate von 0,6 ml/min durchgeführt und die Signale bei einer Wellenlänge von 280 nm wurden dargestellt.

3.2 HERSTELLUNG VON MIT BAKTERIORHODOPSIN BELADENEN NANODISCS

Das Beladen der Nanodiscs mit bR wurde in dieser Arbeit basierend auf der Arbeit von Katzen *et al.* (2008) durchgeführt. Dabei wurde bR zellfrei über einen *E. coli*-Extrakt in Anwesenheit von Nanodiscs exprimiert. Über einen noch unbekannten Mechanismus wird bR kotranslational in die Membran der Nanodiscs eingebaut. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das Membranprotein nicht in Kontakt mit Detergenzien kommt, welche seine Stabilität und Faltung beeinflussen können, und aufwendige Rekonstitutionsmaßnahmen umgangen werden.

Das folgende Kapitel beschreibt die Herstellung von bR-beladenen Nanodiscs über zellfreie Proteinsynthese. Dafür wurde zunächst das vorhandene Expressionsplasmid so mutiert, dass es die Expression von bR im Leserahmen mit einem Affinitätstag erlaubt. Nach der zellfreien Proteinsynthese unter Zugabe der in Kapitel 3.1.2 hergestellten Nanodiscs wurden bR-beladene Nanodiscs aus einem Gemisch von präzipitiertem bR und leeren Nanodiscs gereinigt. Der Einbau von bR in Nanodiscs wurde über Western Blot und Größenausschlusschromatographie gezeigt. Die korrekte Faltung von bR konnte anhand seines charakteristischen Absorptionsmaximums bei ca. 550 nm überprüft werden.

3.2.1 Mutagenese des bR-Expressionsplasmids

Das Expressionsplasmid pEXP5-CT/bR erlaubt die Expression von bR unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Die Abstände und Sequenzen zwischen Promotor, ribosomaler Bindestelle (RBS) und Startcodon waren so gewählt, dass sie für die Verwendung des Expressway *E. coli* Expressionskits zur zellfreien Proteinsynthese optimal sind. Der Abstand zwischen T7-Promotor und RBS sollte zwischen 15 und 20 Nukleotide betragen und der zwischen RBS und Startcodon 7 bis 9 Nukleotide. Um nach der *in vitro* Expression beladene von unbeladenen Nanodiscs trennen zu können, wurde ein Affinitätstag benötigt. Unter Verwendung des „QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis“ Kits wurde die bereits am 3'-Ende des bR-Gens vorliegende kodierende Sequenz für einen His-Tag aktiviert, indem das dazwischenliegende Stopcodon mit Hilfe der Primer bR mut_f und bR mut_r zu einem Serincodon (TCG) mutiert wurde, sodass die Expression von bR mit C-terminalem His-Tag möglich war. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung verifiziert (Abb. 10).

vor Mutagenese:	A G D G A A A T S *
pEXP5-CT/bR	801 cgcgggtgacggtgcggcgcgtacctccttagaagggtcatcatcaccatt
pEXP5-CT/bR-TCG	81c.....
nach Mutagenese:	A G D G A A A T S S K G H H H H H H *

Abb. 10 Sequenzierergebnis der Mutagenese von pEXP5-CT/bR. Das Adenin an Position 830 wurde durch ein Cytosin ersetzt. Das so entstandene Konstrukt, pEXP5-CT/bR-TCG, kodierte nun für bR mit C-terminalem His-Tag.

3.2.2 Zellfreie Proteinsynthese von Bakteriorhodopsin in vorgeformte Nanodiscs

Für die zellfreie Proteinsynthese wurde das Kit „Expressway Cell-Free *E. coli* Expression System“ verwendet, welches Transkription und Translation der DNA in einem Schritt erlaubt. Das Kit basiert auf einem optimierten *E. coli*-Extrakt, der die Stabilität der DNA erhöht und somit höhere Proteinausbeuten garantiert. Die Reaktionen wurden wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Zusätzlich wurden zu den Reaktionsansätzen leere Nanodiscs in einer Konzentration von 1,35 mg/ml zugeführt (genaue Durchführung siehe Kapitel 2.2.3.2). Nach Ablauf der zweieinhalbstündigen Expressionszeit hatte der Ansatz eine Rosafärbung angenommen, was bereits auf eine Einlagerung von bR in die Membran der Nanodiscs hindeutete. Eine schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der bR-beladenen Nanodiscs ist in Abb. 11 zu sehen.

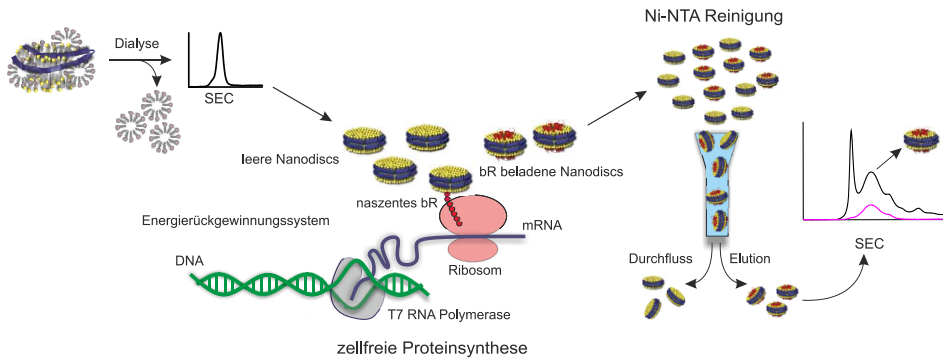


Abb. 11 Schematische Darstellung der Herstellung von bR-beladenen Nanodiscs. Leere Nanodiscs wurden assembliert, indem MSP1 und DMPC in Anwesenheit von Detergens inkubiert wurden. Nach Entfernen des Detergens wurden die Nanodiscs über Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die unbeladenen Nanodiscs wurden zur zellfreien Proteinsynthese hinzugefügt. Es wurde gezeigt, dass bR kotranslational in die Nanodiscs eingebaut wird (Katzen *et al.*, 2008) und dadurch korrekte Faltung erlangt. bR-beladene wurden von unbeladenen Nanodiscs über Ni-NTA getrennt und über Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt.

Beladene Nanodiscs wurden über den His-Tag am bR von den unbeladenen Nanodiscs und anderen Komponenten des *E. coli*-Extrakts getrennt. Dazu wurde der lösliche Überstand der Reaktion einer IMAC über Ni-NTA unterzogen (Durchführung siehe Kapitel 2.2.3.2). Die verschiedenen Fraktionen der Reinigung wurden über eine SDS-PAGE analysiert (Abb. 12). bR war bereits als schwache, aber distinkte Bande im Gesamtextrakt zu sehen (Abb. 12, Spur 1). Die Koelution von bR und MSP1 in Form einer Doppelbande auf Höhe der 25 kDa-Markerbande deutete auf einen Einbau von bR in die Nanodiscs hin (Abb. 12, Spuren 7 bis 11).

Der größte Teil der bR-beladenen Nanodiscs wurde bereits mit 250 mM Imidazol von der Ni-NTA eluiert und war in den ersten beiden Elutionsfraktionen zu finden (Abb. 12, Spuren 7 – 8). Durch zwei weitere Elutionsschritte mit 250 mM Imidazol und einem Elutionsschritt mit 750 mM Imidazol eluierten die restlichen bR-beladenen Nanodiscs vollständig von der Säule (Abb. 12, Spuren 9 – 10: Elution mit 250 mM Imidazol, Spur 11: Elution mit 750 mM Imidazol). Ein letzter Elutionsschritt mit 750 mM Imidazol zeigte, dass kein Protein mehr von der Säule eluierte (Abb. 12, Spur 12). Das Molekulargewicht von bR beträgt 28 kDa, das von MSP1 23 kDa.

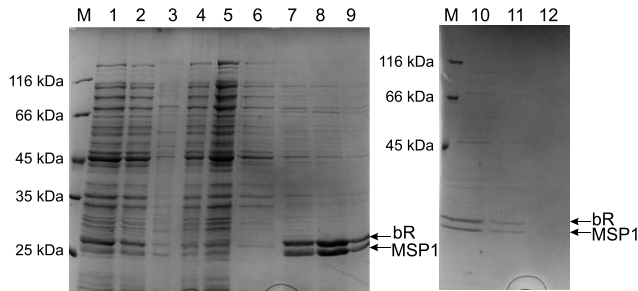


Abb. 12 SDS-PAGE der Reinigung von bR-beladenen Nanodiscs über Ni-NTA. 12%iges SDS-Gel. M: Unstained Protein Marker; 1: Gesamtextrakt; 2: lösliche Fraktion; 3: unlösliche Fraktion; 4: Durchlauf; 5: Waschfraktion 1; 6: Waschfraktion 2; 7: Elutionsfraktion I-1; 8: Elutionsfraktion I-2; 9: Elutionsfraktion I-3; 10: Elutionsfraktion I-4; 11: Elutionsfraktion II-1; 12: Elutionsfraktion II-2.

Es wurde ein Western Blot durchgeführt, um beide Proteine eindeutig zuzuordnen (Durchführung siehe Kapitel 2.2.4.1). Die Reihenfolge der Fraktionen auf dem Western Blot (Abb. 13) entspricht der in der SDS-PAGE (Abb. 12). MSP1 ist eine verkürzte Form des Apolipoproteins A-I und lässt sich deshalb mit Hilfe eines Apolipoprotein A-I spezifischen Antikörpers nachweisen. Wie in Abb. 13a zu sehen ist, läuft die MSP1 spezifische Bande knapp unterhalb der 25 kDa Markerbande und ist während der Reinigung in allen Fraktionen detektierbar. Im Gesamtextrakt entspricht die Intensität der Banden der eingesetzten Menge an Nanodiscs, wobei es sich hierbei um eine Mischung aus beladenen und nicht beladenen Nanodiscs handelt.

Für den Nachweis von bR wurde ein Penta-His Antikörper verwendet, welcher bR über den His-Tag detektiert (Abb. 13b). bR wurde leicht oberhalb der 25 kDa-Markerbande nachgewiesen. Die stärksten Signale wurden in den Elutionsfraktionen I-1 bis I-3 detektiert (Abb. 13b, Spuren 7 bis 9). In den Fraktionen des Gesamtextrakts und des Überstandes konnte bR nur schwach detektiert werden. Dies lag vermutlich daran, dass bR von den zahlreichen anderen Proteinen im Lysat überdeckt wurde. In der Gesamtextraktfraktion waren weitere Signale oberhalb von 55 kDa zu sehen (Abb. 13b, Spur 1). Dabei handelte es sich vermutlich um bR-Aggregate, die langsamer in der SDS-PAGE wandern. Mittels Zentrifugation konnten diese entfernt werden.

Der Western Blot zeigt eindeutig, dass es sich bei der oberen Bande um bR und bei der unteren um MSP1 handelt. Die Koelution von bR und MSP1 deutet darauf hin, dass bR in die Nanodiscs eingebaut wurde.

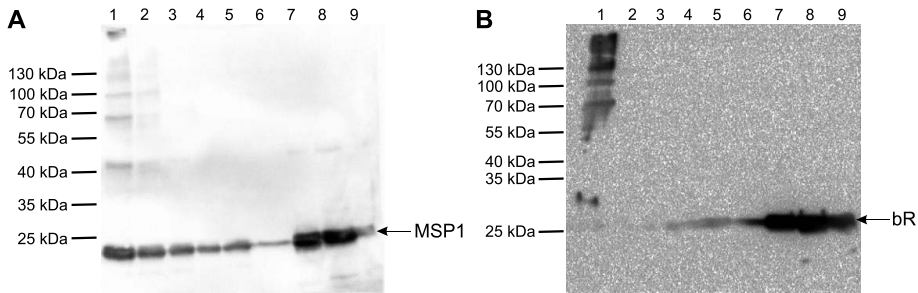


Abb. 13 Western Blot Analyse der Reinigung von bR-beladenen Nanodiscs über Ni-NTA.

Die MSP1-Detektion erfolgte über den Apolipoprotein A-I Antikörper (Verdünnung 1:4000 in PBS) als primären Antikörper und den Donkey Anti-goat Antikörper als sekundären Antikörper (Verdünnung 1:20000 in PBS) (A). Die Detektion von bR fand über den Penta-His Antikörper (Verdünnung 1:5000 in TBS-T) als primären Antikörper und dem Goat Anti-mouse Antikörper als sekundären Antikörper (Verdünnung 1:5000 in TBS-T) statt. 12%iges SDS-Gel. 1: Gesamtextrakt; 2: lösliche Fraktion; 3: unlösliche Fraktion; 4: Durchlauf; 5: Waschfraktion 1; 6: Waschfraktion 2; 7: Elutionsfraktion I-1; 8: Elutionsfraktion I-2; 9: Elutionsfraktion I-3.

Eine Größenausschlusschromatographie mit den Elutionsfraktionen I-1 bis I-3 wurde durchgeführt, um bR-beladene Nanodiscs von Verunreinigungen und anderen möglichen bR-Formen zu trennen (Abb. 14). Dazu wurden diese Elutionsfraktionen vereint und auf eine HiLoad XK 16/600 Superdex 200 pg Säule geladen. bR wurde über sein charakteristisches Absorptionsmaximum bei $\lambda \approx 550$ nm detektiert. Das Spektrum bei $\lambda = 280$ nm wurde aufgenommen, um sowohl bR als auch MSP1 zu visualisieren. Das Chromatogramm zeigte, dass der Großteil des bR bei einem Retentionsvolumen eluierte, welches Partikelgrößen von 12 nm Durchmesser zugeordnet werden konnte (Abb. 14a). Ein weiterer Peak erschien zu einem späteren Zeitpunkt, welcher eine geringere Intensität bei einer Absorption bei 550 nm und eine höhere bei 280 nm als der vorherige Peak zeigte und implizierte Partikel mit einem Durchmesser von 10 nm. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um verschiedene Populationen von bR-beladenen Nanodiscs. Der Peak, der bei einem Stokes Durchmesser von 12 nm eluierte, beinhaltete vermutlich Nanodiscs mit mehreren Kopien von bR, während der zweite Peak aus Nanodiscs mit nur einem bR-Molekül bestand. Der Peak, der im Ausschlussvolumen der Säule eluierte (47 ml), wurde nicht weiter untersucht. In Publikationen, in denen bR ebenfalls über zellfreie Proteinsynthese in Nanodiscs inkorporiert wurde, erschien in den Chromatogrammen auch ein Peak im Ausschlussvolumen der Säule (Katzen *et al.*, 2008, Cappuccio *et al.*, 2008). Eine Untersuchung dieses Peaks ergab dort, dass dieser kein Protein enthielt, sondern vermutlich auf die Streuung von größeren Lipidaggregaten zurückzuführen war.

Für den Einsatz als Zielprotein im Phagendisplay wurden die Fraktionen gewählt, welche mehrere Moleküle bR pro Nanodisc enthielten, weil diese einen höheren Gehalt an dem Zielprotein gewährleisteten. Die Analyse der Probe über analytische Größenausschlusschromatographie zeigte, dass die bR-beladenen und gereinigten Nanodiscs stabil und homogen waren (Abb. 14b). Die Ausbeute der bR-beladenen Nanodiscs aus einer 1 ml Reaktion des verwendeten Kits zur zellfreien Proteinsynthese betrug nach Reinigung über IMAC und Größenausschlusschromatographie durchschnittlich 600 µg.

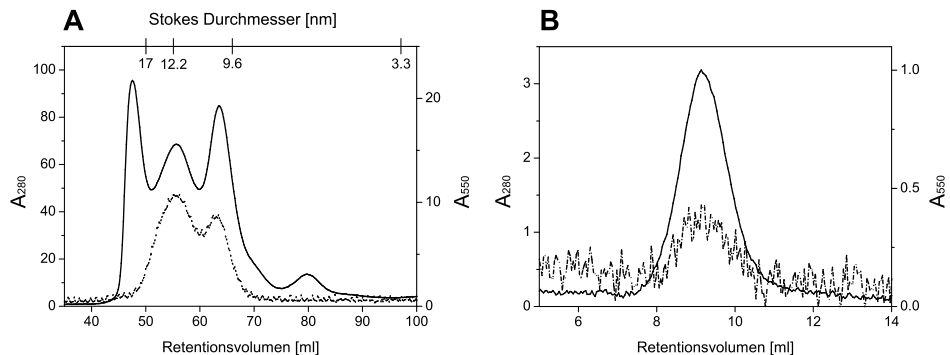


Abb. 14 Größenausschlusschromatogramme von bR-beladenen Nanodiscs. Ni-NTA gereinigte bR-beladene Nanodiscs wurden über eine HiLoad XK 16/600 Superdex 200 pg Säule (Flussrate: 0,5 ml/min) getrennt (A). bR-beladene Nanodiscs mit einem Durchmesser von 12 nm wurden vereint und zur Überprüfung der Stabilität auf eine Superdex 200 10/300 GL Säule (Flussrate: 0,5 ml/min) geladen (B). Durchgehende Linien zeigen die Detektion der Signale bei 280 nm, gestrichelte Linien die Detektion bei 550 nm.

Zur Charakterisierung und Analyse der bR-beladenen Nanodiscs wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen (Abb. 15). Dieses zeigte ein für dunkeladaptierte bR Monomere charakteristisches Absorptionsmaximum bei 546 nm (siehe Kapitel 2.2.3.3). Da die Probe dunkel gelagert und sie vor der Aufnahme des Absorptionsspektrums nicht explizit dem Licht ausgesetzt wurde, zeigte das Spektrum die dunkeladaptierte Form des Proteins. Bei trimerem bR wäre ein Absorptionsmaximum bei 558 nm zu erwarten gewesen (Wang *et al.*, 2002). Demnach führten mehrere Kopien von bR innerhalb einer Nanodiscs nicht zwangsläufig zur Bildung eines Trimers, welches die native Form von bR darstellt.

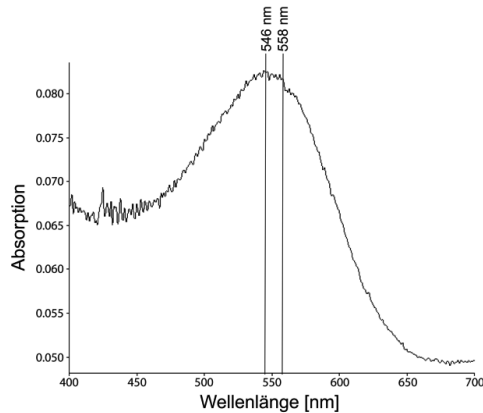


Abb. 15 Absorptionsspektrum von dunkeladaptierten bR-beladenen Nanodiscs. Das Absorptionsmaximum bei ~ 550 nm wies darauf hin, dass bR korrekt gefaltet war. Das Spektrum zeigte ein Maximum bei 546 nm, welches charakteristisch für monomeres bR ist, während ein Maximum bei 558 nm auf trimeres bR hindeuten würde.

3.3 IMMOBILISIERUNG BELADENER UND UNBELADENER NANODISCS AUF MIKROTITERPLATTEN

Das Screening der Phagenbibliothek während des Phagendisplays erfolgt in der Regel am immobilisierten Zielprotein. Die Immobilisierung ist auf verschiedenen Oberflächen wie z.B. SPR-Sensorchips oder Immunoröhrchen möglich (Malmborg *et al.*, 1996; Kretzschmar *et al.*, 1995). Klassischerweise findet die Immobilisierung des Zielproteins aber auf Mikrotiterplatten statt.

Vor der Durchführung des Phagendisplays musste daher sichergestellt werden, dass Nanodiscs auf der Oberfläche von Mikrotiterplatten gekoppelt werden können. Es wurden daher zwei Arten von Mikrotiterplatten getestet. Zum einen wurden Ni-NTA-beschichtete Platten („Ni-NTA HisSorb Strips“ Mikrotiterplatten) verwendet, welche eine Bindung an die Oberfläche über den His-Tag von bR vermitteln. Zum anderen wurden Aminoplatten („Nunc Immobilizer Amino“ Mikrotiterplatten) getestet. Diese Platten ermöglichen die kovalente Kopplung des Zielproteins über freie Aminogruppen, wie sie beispielsweise in Lysinresten vorkommen. Im Falle von bR-beladenen Nanodiscs stehen fünf Lysine in Regionen von bR, welche aus der Membran ragen, und 18 Lysine im MSP1 der Nanodisc für die Aminkopplung zur Verfügung.

Für die Untersuchung der am besten geeigneten Kopplungsmethode wurde eine Konzentrationsreihe (0,1 bis 10 μg pro Well) von beladenen und unbeladenen

Nanodiscs angelegt. Die Kopplung von unbeladenen Nanodiscs war nötig, da diese in der Analyse der selektierten Phagen aus dem Phagendisplay als Kontrolle dienten. Die Nanodiscs wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl über Nacht in den Wells der entsprechenden Mikrotiterplatten inkubiert. Im Falle der Kopplung von unbeladenen Nanodiscs auf den Ni-NTA-beschichteten Platten wurden Nanodiscs verwendet, bei denen der His-Tag nicht vom MSP1 abgespalten wurde. Die erfolgreiche Immobilisierung wurde über einen ELISA mittels des Apolipoprotein A-I Antikörpers nachgewiesen (Durchführung siehe Kapitel 2.2.4.2).

Auf den Ni-NTA-beschichteten Platten konnte auch bei höheren Konzentrationen keine Bindung der bR-beladenen Nanodiscs detektiert werden (Abb. 16a). Bei den unbeladenen Nanodiscs konnten zwar Signale detektiert werden, welche bei steigenden Konzentrationen leicht anstiegen, eine Sättigung wurde allerdings nicht erreicht. Dies lässt daher auf eine eher schwache Bindung der Nanodiscs an die Platte oder auf ein Ablösen durch den Waschpuffer schließen.

Auf den Aminoplatten war es im Gegensatz dazu möglich sowohl unbeladene als auch beladene Nanodiscs zu koppeln (Abb. 16b). Bei beiden war bei einer Menge von 1 µg Nanodiscs je Well die Sättigung erreicht. Da es sich um eine kovalente Kopplungsmethode handelte, war ein Ablösen der Nanodiscs selbst unter stringentem Waschen unwahrscheinlich. Bei den unbeladenen Nanodiscs waren höhere Signalintensitäten detektiert worden als bei den beladenen. Ein Grund dafür könnte in der Zugänglichkeit des Antikörperepitops liegen. Bei den beladenen Nanodiscs könnte ein Hinausragen von bR-Molekülen aus den Rändern der Nanodiscs zu sterischen Behinderungen geführt haben. Eine Immobilisierung der bR-beladenen Nanodiscs auf den Aminoplatten konnte dennoch nachgewiesen werden. Daher wurde im Phagendisplay die Immobilisierung des Zielproteins auf „Nunc Immobilizer Amino“ Mikrotiterplatten durchgeführt.

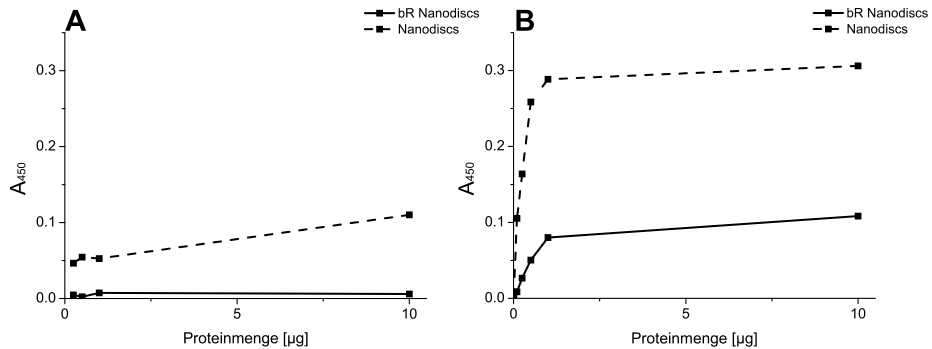


Abb. 16 Kopplung von bR-beladenen und unbeladenen Nanodiscs auf Mikrotiterplatten. Die Bindung von bR-beladenen und unbeladenen Nanodiscs wurde auf Ni-NTA-beschichteten Platten (A) und auf Nunc Immobilizer Aminoplaten (B) untersucht. Immobilisierte Nanodiscs wurden über einen HRP-gekoppelten Apolipoprotein A-I Antikörper nachgewiesen. Die Quantifizierung erfolgte nach Abstoppen der Farbreaktion durch das Substrat TMB über die Absorption bei $\lambda = 450$ nm.

3.4 SELEKTION VON LIGANDEN GEGEN BAKTERIORHODOPSIN-BELADENE NANODISCS ÜBER PHAGENDISPLAY

bR-beladene Nanodiscs wurden als Zielprotein für die Selektion artifizierter Peptide aus einer Phagenbibliothek eingesetzt (Durchführung siehe Kapitel 2.2.5). Die Phagenbibliothek bestand aus $2,7 \times 10^9$ Phagenklonen, von denen jeder ein anderes 12-mer Peptid auf seiner Oberfläche präsentierte. Die sequenzielle Durchführung von vier Selektionsrunden sollte zur Anreicherung von Phagen führen, die eine hohe Bindungsaffinität zum bR haben. Für die erste Selektionsrunde wurden 2×10^{11} Phagen aus der Phagenbibliothek verwendet. Für jede weitere Selektionsrunde wurden 2×10^{11} Phagen aus der jeweiligen Vorrunde eingesetzt. Die Menge der gebundenen Phagen konnte über den Output-Titer, welcher nach jeder Selektionsrunde aus der Phagenelution bestimmt wurde, quantifiziert werden. Für den Einsatz in der nächsten Selektionsrunde wurden die eluierten Phagen amplifiziert und daraus der Input-Titer bestimmt, um die Phagenlösung auf die gewünschte Konzentration für die nächste Selektionsrunde einzustellen. Über den Anreicherungs-ELISA konnte der Anteil spezifischer und unspezifischer Binder und deren Anreicherung aus Überständen von Gesamphagenamplifikationen nach jeder Selektionsrunde bestimmt werden, indem der Anteil der Binder an bR-beladene Nanodiscs, an leere Nanodiscs und an die Plattenoberfläche ermittelt wurde. Zum Vergleich wurde 1 µl der Phagenbibliothek amplifiziert und im Anreicherungs-ELISA als Nullpunkt eingesetzt. Um einzelne Phagen zu identifizieren, welche bR spezifisch binden, wurde ein Einzelphagen-ELISA

durchgeführt. Es wurden zwei Selektionen unter veränderten Selektionsbedingungen durchgeführt. Die Analyse von Selektion 1 zeigte eine hohe Anzahl an unspezifisch an die Oberfläche der Mikrotiterplatte bindenden Phagen. Daher wurde eine zweite Selektion durchgeführt, in der potentielle freie Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte nach der Immobilisierung der bR-beladenen Nanodiscs durch BSA abgesättigt wurden. Die folgenden Kapitel beschreiben die Ergebnisse aus diesen beiden Selektionen.

3.4.1 Analyse der Selektion 1

Zur Analyse der Selektion 1 wurden 1 µg bR-beladene Nanodiscs auf einer „Nunc Immobilizer Amino“ Mikrotiterplatte gekoppelt. Nach Deaktivieren und Waschen der Oberfläche erfolgte die Inkubation mit den Phagengemischen aus den einzelnen Selektionsrunden. Unspezifische Phagen wurden gewaschen und Phagen mit höherer Affinität wurden eluiert. Die Menge an gebundenen Phagen und deren Anreicherung wurde über den Anreicherungs-ELISA quantifiziert. Dabei war die Signalintensität proportional zu der Menge des umgesetzten Substrats und erlaubte Rückschlüsse auf die durchschnittliche Bindungsstärke der Phagen aus den Phagengemischen an bR-beladene Nanodiscs, leere Nanodiscs und der Plattenoberfläche (genaue Durchführung siehe Kapitel 2.2.5.3). Ist die Signalintensität der Phagengemische an den bR-beladenen Nanodiscs höher als an den leeren Nanodiscs, deutet dies auf eine Selektion von bR-spezifischen Phagen hin. Ist hingegen die Signalintensität an den Kontrollen, d.h. Wells beladen mit leeren Nanodiscs bzw. leere Wells am höchsten, dann spricht dies für eine große Zahl an Nanodisc-spezifische Binder bzw. oberflächenbindende Binder in den Phagenpools. Entscheidend ist dabei die Differenz zwischen den Wells. Ein Anstieg in den Signalintensitäten zwischen den Selektionsrunden deutet auf eine Anreicherung von Phagen während der Selektion hin.

Die höchsten Signalintensitäten und den deutlichsten Anstieg in den Signalintensitäten zeigten die Phagen aus den Selektionsrunden 1 bis 4 an die Oberfläche der Mikrotiterplatte (Abb. 17). Ein Anstieg in den Signalintensitäten der Phagen der Selektionsrunde 1 bis zu den Phagen der Selektionsrunde 4 war auch an bR-beladene Nanodiscs und an leere Nanodiscs zu sehen, allerdings waren die Signalintensitäten nicht so hoch wie an die Oberfläche. Ungewöhnlich war, dass die höchsten Signalintensitäten vor der ersten Selektion (Selektionsrunde 0) beobachtet wurden. Insgesamt waren die meisten Phagen in den untersuchten Phagenpools oberflächenbindende Phagen, wobei erwähnt werden sollte, dass für oberflächenbindende Phagen mehr Bindestellen im leeren Well zur Verfügung stehen als für die anderen Phagen bR- oder Nanodisc-Bindestellen in den gekoppelten Wells,

sodass in den leeren Wells mehr Phagen binden können, was zu höheren Signalintensitäten führt. Da die Signalintensitäten bei den bR-beladenen Nanodiscs höher waren als an den leeren Nanodiscs, enthielten die untersuchten Phagenpools auch bR-spezifische Phagen.

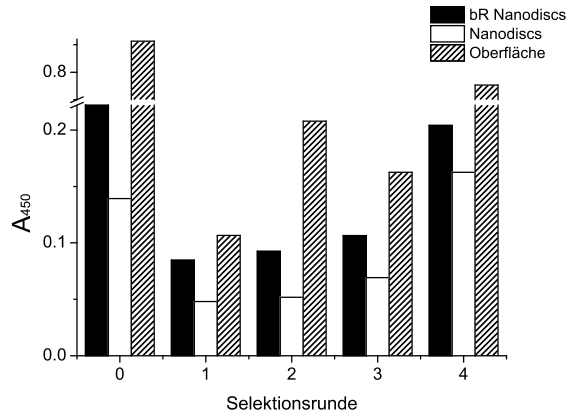


Abb. 17 Anreicherungs-ELISA der Selektion 1. bR-beladene Nanodiscs und leere Nanodiscs wurden auf „Nunc Immobilizer Amino“ Mikrotiterplatten immobilisiert und mit Phagengemischen aus den entsprechenden Selektionsrunden inkubiert. Um die Menge an unspezifisch an die Plattenoberfläche bindenden Phagen zu bestimmen, wurden leere Wells mit den Phagengemischen inkubiert. Die Menge der gebundenen Phagen wurde über einen HRP-gekoppelten M13-Antikörper detektiert. Die Quantifizierung erfolgte nach Abstoppen der Farbreaktion durch das Substrat TMB über die Absorption bei $\lambda = 450 \text{ nm}$.

Obwohl der Anreicherungs-ELISA darauf schließen ließ, dass der Großteil der selektierten Phagen an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden hat, konnten einzelne bR-spezifische Phagen isoliert werden. Um bR-spezifische Phagen von Phagen zu unterscheiden, die an die Nanodisc oder an die Plattenoberfläche binden, wurde ein Einzelphagen-ELISA durchgeführt (Abb. 18).

Die Durchführung erfolgte entsprechend zum Anreicherungs-ELISA. Statt Phagengemischen wurden hier einzelne Phagenklone aus den Selektionsrunden 3 und 4 auf ihre Bindung an bR-beladene Nanodiscs, unbeladene Nanodiscs und das leere Well hin untersucht. Über die Signalintensitäten wurde die Spezifität der getesteten Phagen abgeschätzt. War die Signalintensität eines Phagenklons an bR-beladenen Nanodiscs um 25 % höher als in den Kontrollen, wurde dieser als spezifischer Binder von bR eingestuft. Zeigten Phagenklone die höchsten Signalintensitäten an leeren Nanodiscs bzw. am leeren Well, wurde diese als Nanodisc-spezifisch bzw. als oberflächenbindend eingestuft. Von den 80 untersuchten Einzelklonen waren nach dieser Zuordnung 49 bR-spezifisch, 5 Nanodisc-spezifisch und 17 waren

Oberflächenbinder. Bei 10 Phagen konnte keine eindeutige Spezifität festgestellt werden, da die Signalintensitäten zwar an den bR-beladenen Nanodiscs am höchsten waren, jedoch die der Kontrollen nicht um 25 % überschritten (Abb. 18). Die Signalintensitäten, der bR-spezifisch bindenden Phagen waren im Allgemeinen geringer als die von den oberflächenbindenden Phagen.

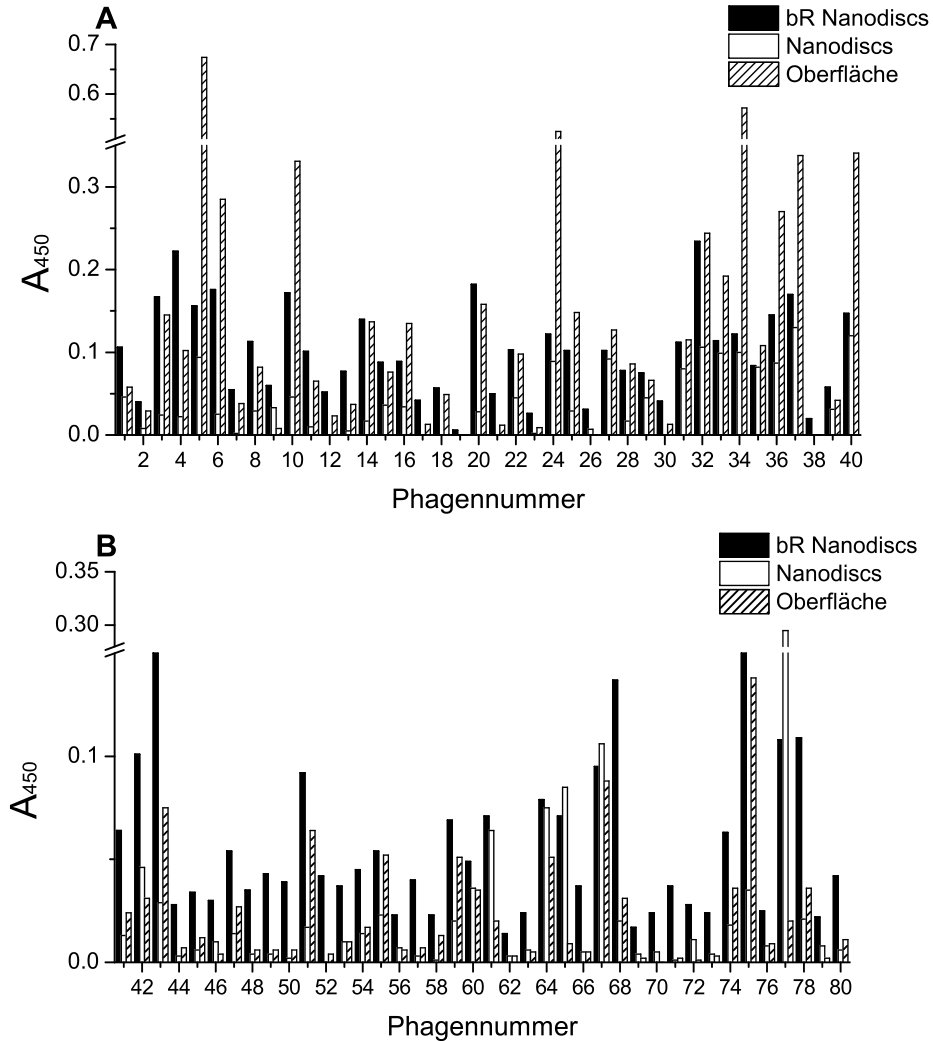


Abb. 18 Einzelphagen-ELISA der Selektion 1. bR-beladene Nanodiscs und unbeladene Nanodiscs wurden auf Nunc Immobilizer Aminoplaten immobilisiert und mit Einzelphagen inkubiert. Leere Wells wurden parallel dazu mit allen Einzelphagen inkubiert. Es wurden Einzelbestimmungen durchgeführt. Die Menge der gebundenen Phagen wurde über einen HRP-gekoppelten M13-Antikörper detektiert. Die Quantifizierung erfolgte nach Abstoppen der Farbreaktion durch das Substrat TMB über die Absorption bei $\lambda = 450$ nm.

Obwohl der Anreicherungs-ELISA auf eine große Anzahl oberflächenbindender Phagen hindeutete, zeigte sich im Einzelphagen-ELISA eine beachtliche Anzahl bR-

spezifischer Phagen. Die DNA der bR-spezifischen Phagen mit den höchsten Signalintensitäten wurde sequenziert. Aus den DNA-Sequenzen wurden die Aminosäureabfolgen der Peptide auf der Phagenoberfläche abgeleitet. Zusätzlich wurden die 4 Phagenklone (Phagennummer 64, 65, 67, 77), die spezifisch für leere Nanodiscs waren, sequenziert. Die Peptidsequenzen der bR-spezifischen Phagen wurden in einem Sequenzalignment, welches manuell mit Unterstützung des Programms Clustal OMEGA erstellt wurde, dargestellt (Abb. 19a). Insgesamt waren keine auffälligen Ähnlichkeiten innerhalb der Sequenzen zu sehen. Einige Sequenzen zeigten untereinander Ähnlichkeiten in einzelnen Aminosäuren, allerdings konnte kein charakteristisches Motiv abgeleitet werden. Die Sequenz GPLKAYILPPKA war siebenmal vorhanden. Alle anderen Sequenzen kamen nur einmal oder zweimal vor. Bei den Sequenzen der Nanodisc-spezifischen Phagen waren hingegen starke Ähnlichkeiten zu sehen (Abb. 19b), da die ersten drei Aminosäuren bei allen nahezu identisch (KVV oder KIW) waren. Daher wurde angenommen, dass das Motiv charakteristisch für Peptide ist, die an leere Nanodiscs binden.

Die bR-spezifischen Klone 74, 39, 1, 22, 19, 2 und 4 präsentierten Peptide, in denen die Aminosäureabfolge KVV, KIV oder KV vorkam. Unter der Annahme, dass das Motiv KVV spezifisch für Nanodiscs ist, wurden diese Klone von weiteren Analysen ausgeschlossen.

A	Phagennummer	Peptidsequenz	B	Phagennummer	Peptidsequenz
	68	GSITQTALIEP		65	KVWSVPQLSHOL
	48	QGEOTDSAPPRE		77	KVWLLETSHISL
	43	LTSALSPQHGEY		64	KIWLINPPPGSE
	58	YPLPPFTHPKRG		67	KIWLINPPPGSE
	70	GPLKAYILPPKA			
	79	GPLKAYILPPKA			
	8	GPLKAYILPPKA			
	23	GPLKAYILPPKA			
	26	GPLKAYILPPKA			
	30	GPLKAYILPPKA			
	38	GPLKAYILPPKA			
	20	GISLLPAINPKI			
	74	SSPMKVWTLIRG			
	39	HLKVVKLPFTSP			
	1	KVWTIDTAHTRA			
	22	KVWTIDTAHTRA			
	19	KVNIQSRHYQT			
	2	KVIGPGFLQSMIT			
	4	EAKIMLIEPIAN			
	13	EKGSLDREYKHN			
	57	HIGHDNHLYPNR			
	42	WPHHSRHHNNH			
	41	NARVLHTGNESL			
	78	LSSSAVTNTTSS			
	21	RTRMRISINSPNL			
	66	VVDIRSQFANQQ			
	73	TYTDNGYFKRST			
	12	YVEQVSTGKARS			
	11	SPNEHLQPVIML			

Abb. 19 Sequenzalignment von Peptiden, welche auf der Oberfläche von selektierten Phagen aus der Phagendisplay Selektion 1 präsentiert wurden. Das Sequenzalignment wurde mit Clustal OMEGA erstellt und manuell weiter bearbeitet. **A** zeigt Sequenzen aus bR-spezifischen Phagen. **B** zeigt Sequenzen aus Nanodisc-spezifischen Phagen.

3.4.2 Analyse der Selektion 2

Ziel der Selektion 2 war durch das Absättigen der Plattenoberfläche mit BSA die Menge der oberflächenbindenden Phagen zu reduzieren. Obwohl „Nunc Immobilizer Amino“ Mikrotiterplatten bereits vom Hersteller mit BSA abgesättigt worden sind, wurden in Selektion 1 dennoch oberflächenbindende Phagen, die sehr hohen Signalintensitäten zeigten, isoliert. Für Selektion 2 wurde daher nach Immobilisierung der bR-beladenen Nanodiscs und Deaktivierung der Oberfläche zusätzlich mit 1 % BSA blockiert. Nach der Durchführung von vier Selektionsrunden zeigte der im Anschluss durchgeführte Anreicherungs-ELISA, dass während den Selektionsrunden der Anteil der bR-spezifischen Phagen nicht zugenommen hatte (Abb. 20). Die höchsten Signalintensitäten wurden auch hier vor der Selektion beobachtet, die niedrigsten bei Selektionsrunde 2. Ein Anstieg der Signalintensität der bR-spezifischen Phagen ist ab Selektionsrunde 2 zu sehen. Die Signalintensitäten der oberflächenbindenden Phagen sind im Allgemeinen gleich groß oder kleiner als die der bR-spezifischen Phagen, was im Vergleich zu Selektion 1 auf eine Reduzierung der Anzahl oberflächenbindender Phagen schließen lässt.

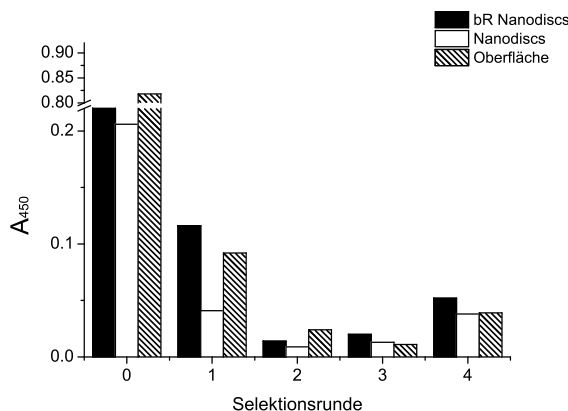


Abb. 20 Anreicherungs-ELISA der Selektion 2. bR-beladene Nanodiscs und leere Nanodiscs wurden auf „Nunc Immobilizer Amino“ Mikrotiterplatten immobilisiert und mit Phagengemischen aus den entsprechenden Selektionsrunden inkubiert. Um die Menge an unspezifisch an die Plattenoberfläche bindenden Phagen zu bestimmen, wurden leere Wells mit den Phagengemischen inkubiert. Die Menge der gebundenen Phagen wurde über einen HRP-gekoppelten M13-Antikörper detektiert. Die Quantifizierung erfolgte nach Abstoppen der Farbreaktion durch das Substrat TMB über die Absorption bei $\lambda = 450$ nm.

Die Bindung 91 einzelner Phagen aus den Selektionsrunden 3 und 4 an bR-beladene Nanodiscs, an unbeladene Nanodiscs und an die Oberfläche wurde im Einzelphagen-ELISA untersucht (Abb. 21). Die Spezifität der Phagen wurde wie in Selektion 1 über die Signalintensitäten abgeleitet. 57 Phagen zeigten spezifische Bindung an bR-

beladene Nanodiscs, 23 an unbeladene Nanodiscs und 1 Phage war spezifisch für die Plattenoberfläche. Die restlichen 11 Phagenklone wie z. B. Klon 131, 134 und 140 konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

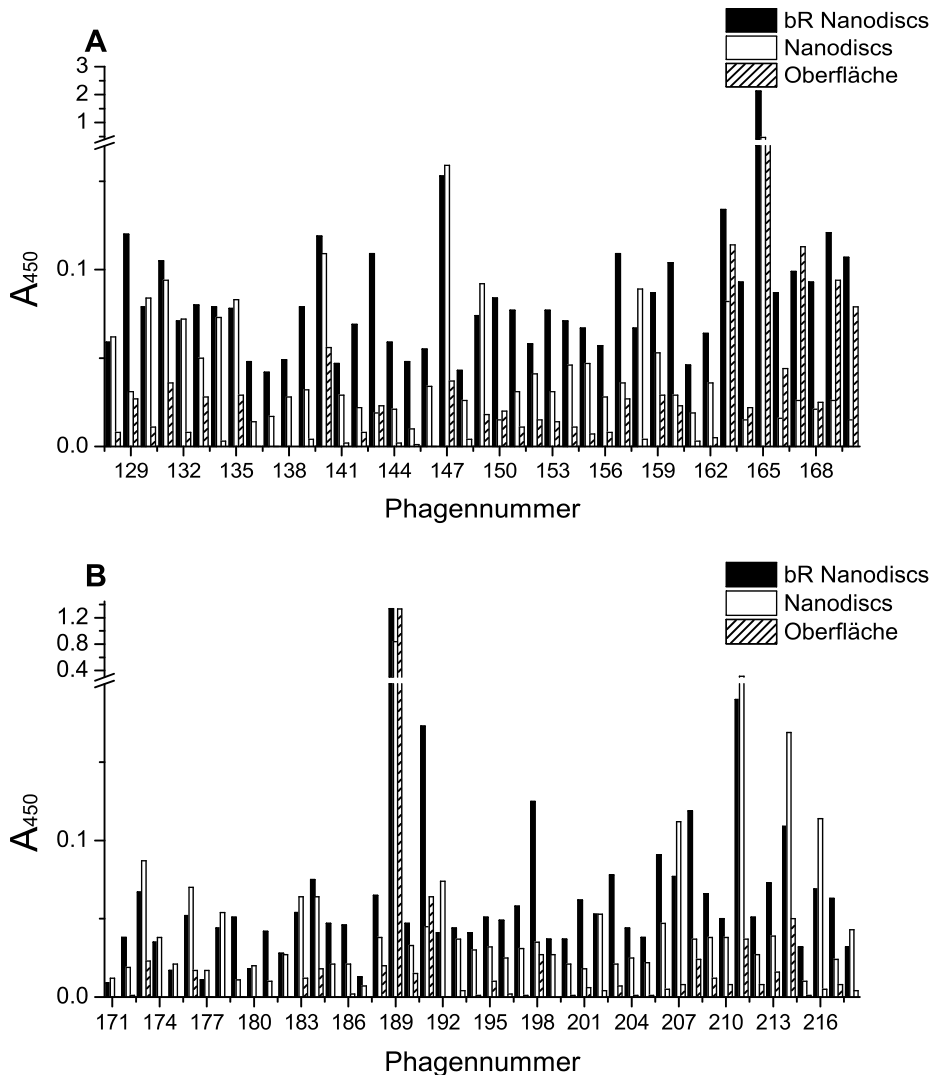


Abb. 21 Einzelphagen-ELISA der Selektion 2. bR-beladene Nanodiscs und unbeladene Nanodiscs wurden auf „Nunc Immobilizer Amino“ Mikrotiterplatten immobilisiert und mit Einzelphagen inkubiert. Leere Wells wurden parallel dazu mit allen Einzelphagen inkubiert. Es wurden Einzelbestimmungen durchgeführt. Die Menge der gebundenen Phagen wurde über einen HRP-gekoppelten M13-Antikörper detektiert. Die Quantifizierung erfolgte nach Abstoppen der Farbreaktion durch das Substrat TMB über die Absorption bei $\lambda = 450$ nm.

Aus dieser Selektion wurden ausschließlich bR-spezifische Phagen sequenziert. Die Peptidsequenzen sind im Alignment in Abb. 22 dargestellt. Ein eindeutiges Motiv, das

in allen Sequenzen vorhanden war, konnte auch hier nicht abgeleitet werden. Identische Gruppen von zwei bis drei Aminosäuren waren innerhalb einiger Sequenzen zu erkennen. Zum Beispiel zeigten vier Sequenzen die Aminosäureabfolge NP und jeweils drei Sequenzen die Aminosäurefolge HN und PP. Bis auf eine Sequenz waren alle Sequenzen nur einmal vorhanden.

Phagennummer	Peptidsequenz
157	HHQNTYANYPRH
160	HHQNTYANYPRH
205	STHGWMDRHH
137	HETVQHNKGMIM
186	DSPTVAHNTSPT
215	NVMIDKHNVNGS
191	NQYMSNGLVWAL
208	DSYMHAYSWRTK
139	IEHNKAWRIPQ
172	SYYGKTDADLT
195	SFQNSTLHGFPVY
217	SEWSPPFWNDMD
143	AAHOEPPAQSDFL
212	GFNTNPPSFPRP
129	DRAMTPIYNBYI
156	SNSTREFNENMF
198	NIQLELNERHLI
151	SNAGGLMSRTWE
209	WSAPGLSSSSAP
197	GDWPAQGMARSA
213	KIMPDQWAIKPW
196	HVTMSWPQTAQN
153	TATIKSEAKSPS
150	SLPEAPIRQYQG
136	SHSEHTQERTTH
142	EVAATSMPCRFSS
165	AVFSQLPRTPHL
201	YVEPQEQSMRYL

Abb. 22 Sequenzalignment von Peptiden, welche auf der Oberfläche von selektierten Phagen aus der Phagendisplay Selektion 2 präsentiert wurden. Das Sequenzalignment wurde mit Clustal OMEGA erstellt und manuell weiter bearbeitet. Die Sequenzen stammten ausschließlich aus bR-spezifischen Phagen.

3.4.3 Zusammenfassung der Analysen von Selektion 1 und Selektion 2

In den Einzelphagen-ELISA beider Selektionen lag der Anteil der bR-spezifischen Phagenklone bei über 60 % der analysierten Klone. In Selektion 1 betrug der Anteil oberflächenbindender Phagen 21 % und der Nanodisc-spezifischer Phagen 5 %. In Selektion 2 banden 1 % der analysierten Phagenklone an die Plattenoberfläche und 25 % an die Nanodiscs. Der Anteil der Phagenklone, die in der Analyse nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, betrug bei Selektion 1 13 % und bei Selektion 2 11 %. Insgesamt schien der zusätzliche Blockierungsschritt bei Selektion 2 die Anreicherung von Phagen, die an die Platte binden, zu minimieren. Allerdings erhöhte sich die Zahl der Phagen, die gegen die leere Nanodisc gerichtet waren. Abb. 23 zeigt das Bindeverhalten einiger Phagen aus beiden Selektionen, die besonders hohe Signalintensitäten zeigten oder mehrmals selektiert wurden (Klon 30). Zum Vergleich

wurden auch drei Nanodisc-spezifische Klone und der Phagenwildtyp dargestellt. Um die Werte besser vergleichen zu können, wurden die Signalintensitäten auf die Bindungsstärke der jeweiligen Phagenklone an die Plattenoberfläche normiert. Drei Klone, die die höchsten absoluten und bR-spezifischen Signale zeigten (43, 68 und 165), wurden in den folgenden Untersuchungen weiter charakterisiert.

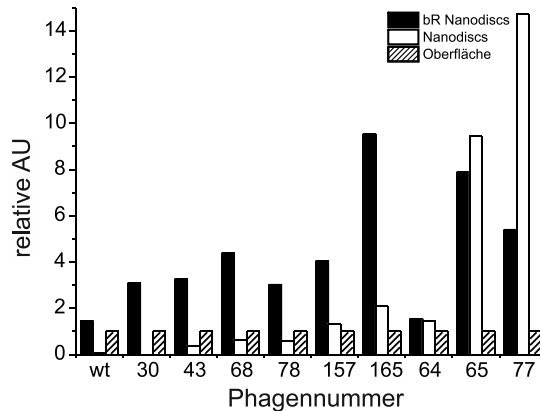


Abb. 23 Einzelphagen-ELISA repräsentativer Klone. Die Werte stellen das Bindeverhalten von Einzelphagen an bR-beladene Nanodiscs, an leere Nanodiscs und an das leere Well dar. Die Werte aus den Wells, die mit bR-beladenen Nanodiscs und leeren Nanodiscs gekoppelt wurden, wurden auf die Werte der leeren Wells normalisiert. wt bezieht sich auf den Phagenwildtyp, welcher kein Peptid auf seiner Oberfläche präsentiert. Die Menge der gebundenen Phagen wurde über einen HRP-gekoppelten M13-Antikörper detektiert. Die Quantifizierung erfolgte nach Abstoppen der Farbreaktion durch das Substrat TMB über die Absorption bei $\lambda = 450 \text{ nm}$.

3.5 EPITOPKARTIERUNG DER PHAGENKLONE GEGEN BAKTERIORHODOPSIN

Um Informationen über die Bindestellen der isolierten Phagen an bR zu bekommen, wurde eine Epitopkartierung durchgeführt. Als mögliche Bindestellen stehen die Bereiche des bR zur Verfügung, die sich außerhalb der Membran befinden. Hierbei handelte es sich um den C- und N-Terminus und um die sechs Loopregionen zwischen den transmembranen Bereichen. Es wurden der C- und N-Terminus und alle sechs Loops von bR als eigenständige, chemisch synthetische Peptide von der Firma JPT Peptide Technologies (Berlin, Deutschland) hergestellt und die Bindung der Phagen an diese Peptide mit Hilfe eines ELISA untersucht. Tabelle 6 (Kapitel 2.1.4) zeigt eine Übersicht über die synthetischen Peptide. Die Loops wurden sowohl als lineare als auch als zyklisierte Peptide getestet. Die Zyklisierung der Peptide erfolgte durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten, um die die Enden der Peptide erweitert waren. Die zyklisierten Peptide sollten die native Konformation der Loops im Protein nachahmen. Alle Peptide bis auf das Peptid „N-Terminus“ wurden N-terminal biotinyliert. Das Peptid „N-Terminus“ wurde C-terminal biotinyliert. Ein auf PEG-basierter Abstandshalter zwischen Biotinrest und Peptid sollte mögliche sterische Probleme reduzieren.

Es wurden jeweils 56 pmol der einzelnen Peptide auf Nunc Immobilizer Streptavidin Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach dem Blockieren freier Bindestellen wurden die Wells gewaschen und mit den selektierten Phagen inkubiert. Über einen HRP-gekoppelten Phagenantikörper wurde die Bindung der Phagen an die bR-Peptide nachgewiesen (genaue Durchführung siehe Kap. 2.2.5.5). Für eine Dreifachbestimmung wurde das gleiche Experiment parallel auf drei Mikrotiterplatten durchgeführt. Damit Werte aus verschiedenen Mikrotiterplatten miteinander verglichen werden können, wurden die Werte referenziert. Als Referenz diente der Phage Fyn36, der an die SH3-Domäne der Tyrosinkinase Fyn bindet (siehe Diplomarbeit Julian Glück). Fyn-SH3 wurde zu diesem Zweck biotinyliert und auf jeder verwendeten Streptavidin-Mikrotiterplatte mitgeführt. Die Signalintensitäten der selektierten Phagen wurden auf die Signalintensität des Phagen Fyn36 normiert. Die daraus resultierenden Werte wurden als relative Affinität der Phagen zu den Peptiden bezeichnet.

Analysiert wurde die Bindung der bR-spezifischen Klone 43, 68 und 165. Um zu zeigen, dass die Bindung der selektierten bR-spezifischen Phagen auf die exponierten Peptide und nicht auf die Phagenhülle zurückzuführen ist, diente Klon 77, der an leere Nanodiscs bindet, als Kontrolle. Als weitere Kontrolle, um eine Kreuzreaktion der bR-Peptide mit der Phagenhülle auszuschließen, diente der Phagenwildtyp, welcher kein fremdes Peptid auf seiner Oberfläche präsentiert.

Die Analyse zeigte, dass die bR-spezifischen Phagenklone an Bereiche von bR gebunden haben, welche außerhalb der Membran lagen. Die Phagenklone 43, 68 und 165 zeigten erhöhte Bindungsstärken an Loop AB (Abb. 24), wobei die Unterschiede in den Bindungsstärken unabhängig davon waren, ob das Looppeptid in linearer oder in zyklisierter Form eingesetzt wurde. Die Phagenklone 43 und 165 zeigten zusätzlich erhöhte Bindungsstärken an Loop EF, während der Phage 68 dort nur geringfügig stärkere Signale zeigte. Die Zyklisierung des Peptids spielte auch hier keine Rolle. Die höheren Bindungsstärken an Loop AB und EF deuteten darauf hin, dass Loop AB und Loop EF ein mögliches Epitop für die selektierten Phagen bildeten.

Der Wildtyp und der Phage 77, der spezifisch für leere Nanodiscs war, zeigten im Vergleich zu den bR-spezifischen Phagen geringere Bindungsstärken, wodurch eine Bindung der Phagenhülle an die Peptide vernachlässigt werden konnte (Abb. 24). Außerdem konnte dadurch gezeigt werden, dass die Bindung der bR-spezifischen Klone an die Looppeptide AB und EF spezifisch über die von ihnen präsentierten Peptiden erfolgte. Das Looppeptid DE zeigte sowohl bei allen getesteten Phagenklonen als auch beim Phagenwildtyp ca. 10-mal höhere Signalintensitäten als die anderen Peptide (Daten nicht gezeigt). Da dies auf eine Kreuzreaktion des Peptids mit der Phagenhülle hindeutete, wurde der Loop DE aus diesem Experiment ausgeschlossen. Eine Kreuzreaktion des Phagenantikörpers mit den bR-Peptiden konnte über eine Kontrolle ausgeschlossen werden, in der die Phagen im Experiment durch Puffer ersetzt wurden. Die Signale, die dabei gemessen wurden, waren nahe Null (Abb. 24).

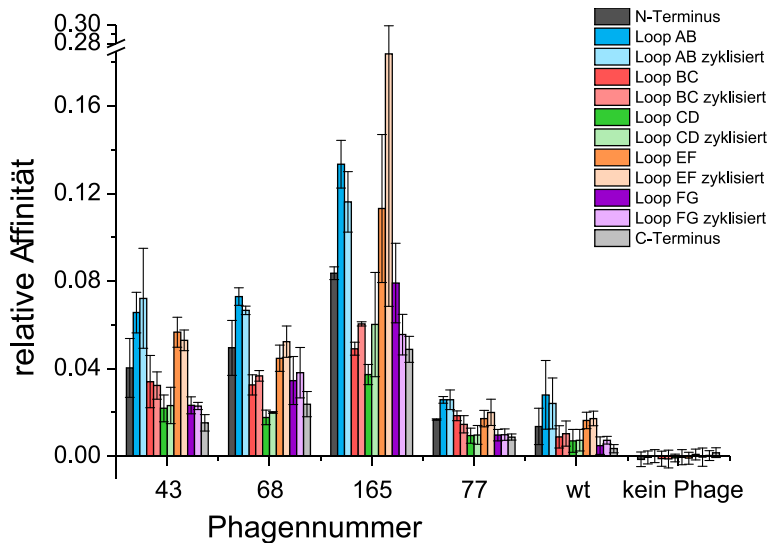


Abb. 24 Epitopkartierung der selektierten Phagenklone gegen bR. Gezeigt ist die Bindung der selektierten Phagenklone an extramembrane Bereiche von bR. Biotinylierte Peptide, welche die Loops und Termini von bR darstellen, wurden auf Streptavidin-beschichtete Platten immobilisiert. Looppeptide wurden sowohl in linearer als auch in zyklisierter Form verwendet. Die Bindung der selektierten Phagen wurde mittels eines Antiphagen-ELISA quantifiziert. Es sind normierte Durchschnittswerte mit Standardabweichungen in Form von Fehlerbalken aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Der Phagenwildtyp (wt), welcher kein Peptid präsentiert, diente als Negativkontrolle. Peptide, welche den Loop DE beinhalten, wurden nicht in das Experiment aufgenommen, da Kreuzreaktivität mit der Phagenhülle beobachtet wurde.

4 DISKUSSION

Membranproteine stellen eine wichtige Klasse von Zielproteinen für die Entwicklung von pharmakologischen Wirkstoffen dar. Durch ihre Einlagerung in die Zellmembran bilden sie wichtige Verknüpfungen in der Weitergabe von Signalen, im Transport von Substraten, in der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und in der Generation von Energie. Die Funktion von Membranproteinen, wie z. B. die Aktivierung von Signalkaskaden, ist meist abhängig von Interaktionspartnern. Durch die Interaktion mit Liganden kann die Funktion von Membranproteinen moduliert werden, wodurch Ansatzpunkte für die Behandlung von Krankheiten geschaffen werden. Beispielsweise moduliert der peptidbasierte ACE-Hemmer Captopril die Funktion des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE), einem bitopischen Membranprotein, und führt so zu einer Senkung des Blutdrucks (Rubin *et al.*, 1978). Ein weiteres Beispiel ist das ebenfalls Peptid-basierte Leprorelin, das als Agonist des Gonadotropin-releasing Hormonrezeptors wirkt. Leprorelin verringert indirekt die Freisetzung des luteinisierenden Hormons und des follikelstimulierenden Hormons und wird unter anderem zur Behandlung hormonabhängiger Krebsarten eingesetzt (Trachtenberg, 1983). Diese Beispiele zeigen, dass peptidbasierte Substanzen wichtige pharmakologische Wirkstoffe darstellen.

Das Phagendisplay ist eine effektive Methode, um Peptid- oder Proteinliganden gegen Zielproteine aus einer großen Bibliothek zu isolieren. In der Vergangenheit konnten viele hochaffine Liganden gegen lösliche Proteine mittels Phagendisplay selektiert werden (Mohrlüder *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2005). Die Anwendung von Phagendisplay auf Membranproteine hingegen ist eine Herausforderung und konnte bisher nur durch aufwändige Selektionsstrategien erreicht werden. Die Hauptschwierigkeit in der Anwendung von Phagendisplay auf Membranproteine liegt in der Notwendigkeit einer Membranumgebung, um diese Proteine in Lösung zu halten und um ihre korrekte Faltung sicherzustellen. Membranmimetika, wie beispielsweise Detergenzien oder Liposomen, werden oft bei der Untersuchung von Membranproteinen eingesetzt, sind aber für Phagendisplay nicht geeignet, weil sie während der Phagenselektion von der Oberfläche gewegewaschen werden können. Außerdem können Detergenzien die Tertiär- und Quartärstruktur der Zielproteine verändern und die Bindung der phagenpräsentierten Peptide beeinflussen.

In dieser Arbeit wurden Nanodiscs als stabile Membranumgebung für ein integrales Membranprotein verwendet und als Zielprotein in einer Phagendisplayselektion

eingesetzt. In Nanodiscs werden die Lipide um das Membranprotein von einem Gerüstprotein festgehalten, sodass die Lipide während der Prozedur nicht gewaschen werden können. Eingebettet in Nanodiscs können Membranproteine fast wie lösliche Proteine behandelt werden. Als Modell für ein integrales, polytopisches Membranprotein diente Bakteriorhodopsin (bR) aus *Halobacterium salinarum*. Mit seinen sieben Transmembranhelices benötigt bR eine Membrenumgebung, um seine korrekte funktionelle Faltung einzunehmen. Die korrekte, native Faltung wird dabei durch die purpurne Färbung des Proteins angezeigt.

Es wurden Peptidliganden gegen bR mit Hilfe einer Phagendisplayselektion identifiziert, indem bR-beladene Nanodiscs als Zielprotein in der Selektion dienten.

4.1 PRÄPARATION DES ZIELPROTEINS

bR wurde in Nanodiscs eingebaut, um eine Membrenumgebung für dieses zu bieten. Nanodiscs bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht, welche von einem amphipathischen Gerüstprotein (MSP) umgeben ist. Diese scheibenförmigen Strukturen sind im Vergleich zu anderen Modellmembranen sehr stabil und monodispers. Der Durchmesser der Nanodiscs ist abhängig vom verwendeten MSP. Der Einsatz des in dieser Arbeit verwendeten MSP1 führt zur Bildung von Nanodiscs mit ~10 nm Durchmesser.

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten Membranproteine in Nanodiscs einzubauen. Typischerweise wird das Membranprotein erst heterolog exprimiert, mit Detergenzien aus Einschlusskörpern oder der Zellmembran solubilisiert und anschließend gereinigt. Membranproteine können auch aus der Membran ihrer Wirtsorganismen solubilisiert und gereinigt werden. Der Einbau des Membranproteins in Nanodiscs erfolgt durch Mischen des gereinigten Membranproteins, welches durch Detergenzien in Lösung gehalten wird, mit dem Lipid und dem MSP in einem bestimmten Verhältnis und durch anschließendes Entfernen der Detergenzien. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nicht alle Membranproteine heterolog in Zellen exprimiert oder aus natürlichen Membranen isoliert werden können. Außerdem können höhere Detergenzkonzentrationen zur Denaturierung des Proteins führen.

Eine Alternative zu dieser Assemblierungsmethode bietet die zellfreie Proteinsynthese, welche in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Diese ermöglicht den Einbau des Membranproteins in die Nanodiscs bereits während der Expression und umgeht dadurch den Einsatz von Detergenzien. Es gibt zwei Möglichkeiten Membranproteine während zellfreier Proteinsynthese in Nanodiscs einzubauen (Katzen *et al.*, 2009). Zum einen kann das Membranprotein mit dem MSP in Anwesenheit von Liposomen

koexprimiert werden. Beladene Nanodiscs müssen anschließend von einem Gemisch aus leeren Nanodiscs, Liposomen und Proteoliposomen getrennt werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass Nanodiscs nicht vorher präpariert werden müssen. Das Verhältnis von Membranprotein kodierender DNA und MSP kodierender DNA während der Reaktion muss für jedes Membranprotein eingestellt werden. Eine andere Möglichkeit ist, vorgeformte, leere Nanodiscs zu der zellfreien Expression hinzuzufügen, um als membrane Stütze für das Membranprotein zu dienen. Das Membranprotein wird hier kotranslational in die Nanodiscs eingebaut. Beladene Nanodiscs können dann aus einem Gemisch von leeren Nanodiscs und präzipitiertem Membranprotein abgetrennt werden. Der Einsatz vorgeformter Nanodiscs liefert im Vergleich zur Koexpression von Membranprotein und MSP höhere Ausbeuten und wurde daher in dieser Arbeit eingesetzt.

4.1.1 Effektivere Nanodisc-Assemblierung durch langsames Entfernen des Detergens

Obwohl bereits optimierte Protokolle für die Assemblierung von leeren Nanodiscs zur Verfügung stehen (Bayburt *et al.*, 2002, Civjan *et al.*, 2003), wurden die Assemblierungsbedingungen an die bestehenden Laborbedingungen angepasst. Bereits geringe Veränderungen der Bedingungen können die Effektivität der Assemblierung beeinflussen. Vor allem das molare Verhältnis zwischen MSP und Phospholipid, welches von der Länge des gewählten MSPs und der Art des Lipids bestimmt wird, ist besonders kritisch (Bayburt und Sligar, 2010). Das optimale Verhältnis zwischen Phospholipid und MSP führt zur vollständigen Assemblierung von Nanodiscs mit nur wenigen Nebenprodukten. Ist das Verhältnis des Lipids zu hoch, bilden sich verschiedenen Populationen von größeren MSP/Lipid-Partikeln, welche als Aggregate im Ausschlussvolumen der Größenausschlusschromatographiesäule eluieren können. Das optimale Verhältnis zwischen MSP1 und DMPC für die Assemblierung von DMPC-Nanodiscs beträgt laut Angaben der Sligar-Gruppe (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA) 1:80 (<http://sligarlabor.life.uiuc.edu/nanodisc/protocols.html>). Von den getesteten molaren Verhältnissen lieferte in dieser Arbeit das Verhältnis 1:70 die besten Ergebnisse (Kapitel 3.1.1). Einige größere Partikel waren in der Größenausschlusschromatographie noch sichtbar, sodass noch eine weitere Verringerung der Lipidmenge denkbar gewesen wäre. Da die Ergebnisse jedoch bereits zufriedenstellend waren, wurde dies nicht weiter ausprobiert. Abweichungen in den molaren Verhältnisse zwischen den veröffentlichten Werten und den hier

gemessen könnten beispielsweise auf Abweichungen in der Bestimmung der Lipidkonzentration oder der Proteinkonzentration zurückzuführen sein.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Erfolg der Nanodisc-Assemblierung auch von der Methode der Natriumcholatrextraktion abhängig ist. Es wurden poröse Polystyrolkugeln, so genannte Biobeads, und Dialyse zur Extraktion des Natriumcholats aus der Assemblierungslösung eingesetzt. Beide getesteten Methoden führten zu einer effektiven Assemblierung von Nanodiscs mit homogener Größe. Der Einsatz von Biobeads führte zur zusätzlichen Bildung von größeren Aggregaten, während die Entfernung des Detergens über Dialyse zu deutlich weniger Nebenprodukten führte. Da während der Dialyse das Detergens viel langsamer entfernt wird, wird den Lipiden und dem MSP mehr Zeit gegeben sich entsprechend den geänderten Bedingungen, die durch die Abnahme der Detergengkonzentration entstanden sind, neu zu ordnen. Der Assemblierungsprozess läuft langsamer ab, wodurch Fehlbildungen eventuell verringert werden.

In den dialysierten Assemblierungsansätzen mit den Verhältnissen 1:80 und 1:90 erschien der Nanodisc-Peak bei einem Retentionsvolumen von 11,1 ml und damit etwas früher als bei dem Ansatz mit dem Verhältnis 1:70, in dem der Peak bei einem Retentionsvolumen von 11,5 ml erschien. Dies deutet auf die Entstehung von größeren Nanodiscs in den Verhältnissen 1:80 und 1:90 hin, was auf einen Einbau von mehr Lipidmolekülen pro Nanodiscs zurückzuführen sein könnte. Da diese Ansätze aber neben größeren Mengen Lipid auch größere Mengen Natriumcholeat beinhalten, wäre es auch möglich, dass die Natriumcholatrextraktion eventuell unvollständig war und dass sich Spuren von Natriumcholeat in den Nanodiscs befinden, was zu einer Erhöhung des Durchmessers führte. Obwohl der Durchmesser der Nanodiscs durch das MSP limitiert ist, kann dieser aufgrund der Elastizität des MSPs leicht variiert werden. Eine Erhöhung der Temperatur hat beispielsweise eine Ausdehnung der Lipidschicht zur Folge, was in eine Erhöhung der Durchmesser der Nanodiscs resultiert (Denisov *et al.*, 2005).

Leichte Abweichungen in den Durchmesser der Nanodiscs zu den Werten in der Literatur (Denisov *et al.*, 2004) wurden vor allem dann beobachtet, wenn zur Bestimmung der Durchmesser die analytische Größenausschlusschromatographiesäule verwendet wurde. Die Abweichungen in der Größenbestimmung könnten auf Abweichungen in der Säulenkalibrierung zurückzuführen sein.

4.1.2 Nanodiscs sind auch bei hohen Konzentrationen stabil

Da in früheren Arbeiten, in denen Membranproteine während zellfreier Expression in Nanodiscs eingebaut wurden, die Endkonzentration der Nanodiscs in den Reaktionsansätzen 9 μM betrug (Katzen *et al.*, 2008), wurde diese Konzentration auch in dieser Arbeit eingesetzt. Da ein Kit verwendet wurde, in dem die Reaktionsvolumina der einzelnen Komponenten der *in vitro* Transkription und Translation vorgegeben waren, konnten kaum Modifikationen des Protokolls vorgenommen werden. Die Nanodiscs mussten daher in einem möglichst geringen Volumen hinzugefügt werden, um das Gesamtvolumen der Reaktion nicht zu überschreiten. Dies erforderte hohe Konzentrationen an Nanodiscs, welche über Ultrafiltrationskonzentratoren bei sehr geringen Drehzahlen erreicht wurden, um Zerfall oder Verschmelzung der Nanodiscs vorzubeugen. Über Größenausschlusschromatographie konnte gezeigt werden, dass die Nanodiscs bei Konzentrationen von bis zu 250 μM stabil geblieben sind, höhere Konzentrationen wurden nicht getestet.

4.1.3 Erfolgreicher Einbau von bR in Nanodiscs über zellfreie Proteinsynthese

Das Beladen der Nanodiscs mit bR über zellfreie Proteinsynthese war erfolgreich. Die Bildung von funktionalem bR war bereits kurze Zeit nach Zugabe des Retinals zum Reaktionsansatz anhand der Absorption bei 550 nm visualisierbar. Das Retinal, welches als chromophore Gruppe dient, wird kovalent an das Lys216 des Proteins gebunden und dient als Hinweis auf die Funktionalität und korrekte Faltung des Proteins. Das exprimierte Protein war löslich, was auf eine Einlagerung des bR in die Membran der Nanodiscs hindeutete. Die Koelution von bR und MSP1 in der IMAC-Reinigung war ein weiterer Hinweis auf den korrekten Einbau von bR in Nanodiscs (Abb. 12 und 13).

Die Größenausschlusschromatographie deutete auf eine Heterogenität in der Anzahl der bR-Moleküle pro Nanodisc hin. Heterogenität in der Größenausschlusschromatographie konnte in früheren Publikationen schon beobachtet werden, in denen zellfreie Proteinsynthese für die Bildung von bR-beladenen Nanodiscs eingesetzt wurde (Katzen *et al.*, 2008; Cappuccio *et al.*, 2008). Bayburt *et al.* (2006) haben gezeigt, dass mehrere Moleküle bR in einer Nanodisc Platz finden. Abhängig von den Assemblierungsbedingungen kommen in den Ansätzen von Bayburt *et al.* die bR Moleküle als Monomere oder als geordnete Trimere vor. Die Größenausschlusschromatogramme zeigten, dass zwei Populationen von bR-beladenen Nanodiscs entstanden waren (Abb. 14a). Eine Population enthielt

vermutlich Nanodiscs, in denen nur ein bR-Molekül eingebaut war, die andere Population Nanodiscs mit mehreren bR-Molekülen. Für die Experimente wurden bR-beladene Nanodiscs verwendet, welche vermutlich mehrere Kopien von bR enthielten. Ein Absorptionsspektrum zeigte, dass, obwohl die Nanodiscs mehrere bR-Moleküle enthielten, diese als Monomere und nicht als Trimere vorlagen (Abb. 15). Der Einbau von bR in Nanodiscs mittels zellfreier Expression führt ausschließlich zur Bildung von bR-Monomeren und zwar unabhängig von der Größe der Nanodiscs bzw. der Länge des MSP (Katzen *et al.*, 2008). Dies liegt daran, dass der Einbau von bR in die Nanodiscs zufällig bezüglich der Orientierung der Proteine zueinander stattfindet, sodass die Wahrscheinlichkeit, dass sich Trimere bilden können, gering ist. Außerdem konnten Bayburt *et al.* zeigen, dass bei Verwendung von MSP1 als Gerüstprotein keine bR-Trimere in Nanodiscs eingebaut werden können. Obwohl die native Form des bR das Trimer ist, ist der Photozyklus von bR-Monomeren qualitativ derselbe wie der des bR-Trimers. Lediglich die Effizienz und die thermische Stabilität sind reduziert, was auf eine regulatorische und stabilisierende Rolle der bR-Nachbarmoleküle hindeutet (Dencher *et al.*, 1983; Brouillette *et al.*, 1989).

4.1.4 Zellfreie Proteinsynthese als allgemeine Methode zum Einbau von Membranproteinen in Nanodiscs

Neben der hier dargestellte Methode zur Herstellung von bR-beladenen Nanodiscs sind auch andere potentiell effektivere Methoden bekannt (Bayburt und Sligar 2003, Bayburt *et al.*, 2006). Zum Beispiel kann bR aus der Purpurmembran von *Halobacterium salinarum* mit Triton solubilisiert und mit einer MSP/DMPC/Cholat-Lösung in einem definierten Verhältnis gemischt werden. Unter Anwendung von Biobeads werden anschließend die Detergenzien entfernt. Je nach Wahl des Verhältnisses der einzelnen Komponenten kann der Einbau des bR als Monomer oder als Trimer erfolgen.

Obwohl sich über diese Methode höhere Ausbeuten an bR-beladenen Nanodiscs erzielen lassen, wurde in dieser Arbeit zellfreie Proteinsynthese für die Beladung der Nanodiscs mit bR gewählt. Ein Vorteil der zellfreien Proteinsynthese ist, dass der Einsatz von Detergenzien, welche Membranproteine destabilisieren können, vollständig umgangen wird. Außerdem ist die von Bayburt *et al.* vorgestellte Methode nur begrenzt anwendbar. *Halobacterium salinarum* ist ein einfach zu kultivierender Organismus, dessen Membran zum Großteil mit bR übersät ist, wodurch sich bR leicht in großen Mengen isolieren lässt. Andere Membranproteine lassen sich nicht einfach in großen Mengen aus den Membranen ihrer Wirte isolieren. Vor allem die heterologe Expression von rekombinanten Membranproteinen erfordert meist das Ausprobieren

zahlreicher Expressionswirte. Aufgrund ihrer starken Hydrophobizität sind sie häufig toxisch für den Wirtsorganismus und deren Solubilisierung und Reinigung muss oft langwierig optimiert werden. Da bR nur als Modellmembranprotein dienen sollte, war in dieser Arbeit die Verwendung einer auch für andere Zielproteine geeigneten Assemblierungsmethode das Ziel, um eine möglichst breit anwendbare Strategie auszuarbeiten. Die zellfreie Proteinsynthese von Membranproteinen im Beisein von Nanodiscs kann ohne größere Modifikationen des Protokolls auf andere Membranproteine übertragen werden und wurde bereits auf eine Vielzahl von Membranproteinen erfolgreich angewandt. Bei allen getesteten Membranproteinen führte die Anwesenheit der Nanodiscs zu einer besseren Löslichkeit der Proteine (Katzen *et al.*, 2008; Lyukmanova *et al.*, 2012). Insgesamt benötigt man in der zellfreien Proteinsynthese von der DNA bis zum inkorporierten bR in Nanodiscs nur zweieinhalb Stunden, während dies bei dem Ansatz von Bayburt *et al.* mehrere Tage dauern würde. Daher bietet die zellfreie Proteinsynthese eine enorme Zeitersparnis. Allerdings sind die hergestellten Mengen an Protein geringer, was in dieser Arbeit aber keinen Nachteil darstellte.

In dieser Arbeit wurde ein kommerziell erhältlicher *E. coli*-Extrakt verwendet. Extrakte auf Eukaryotenbasis, wie beispielsweise Weizenkeimextrakte oder Extrakte aus Kanninchenretikulozyten, sind auch erhältlich. Obwohl die Ausbeuten aus eukaryotischen Systemen geringer sind, so können diese dennoch von Vorteil sein, wenn posttranslationale Modifikationen berücksichtigt werden müssen (Katzen *et al.*, 2005).

4.2 PHAGENDISPLAY GEGEN MIT BAKTERIORHODOPSIN BELADENE NANODISCS LIEFERTE BAKTERIORHODOPSIN-SPEZIFISCHE LIGANDEN

Phagendisplay ist eine zuverlässige und effektive Methode, um aus einer randomisierten Peptidbibliothek zielproteinspezifische Liganden zu isolieren. Diese Methode wurde 1985 zum ersten Mal beschrieben und seitdem ständig weiterentwickelt. Hier wurde zum ersten Mal ein in Nanodiscs inkorporiertes Membranprotein als Zielprotein genutzt.

4.2.1 Voraussetzungen für den erfolgreichen Einsatz von Nanodiscs im Phagendisplay

Die Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz von Nanodiscs im Phagendisplay ist die Stabilität der Nanodiscs während der Selektion. Die Standardprozedur sieht den Gebrauch von detergenshaltigem Puffer vor, um während den Selektionsrunden nicht oder schwach unspezifisch gebundene Phagen durch stringentes Waschen zu entfernen. Detergenzien können sich allerdings aufgrund ihres amphiphilen Charakters in die Lipidschicht der Nanodiscs einlagern und diese somit zerstören. Für Natriumcholat ist bekannt, dass dessen Zugabe zu vorgeformten Nanodiscs den Assemblierungsvorgang umkehren kann (Shih *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde das nicht-ionischen Detergens Tween 20 getestet, das standardmäßig im Waschpuffer verwendet wird. Es konnte gezeigt werden, dass es beim Großteil der Nanodiscs nicht zur Destabilisierung geführt hat (Abb. 9). Dies könnte auf die geringe verwendete Konzentration (0,1%) oder auf den milden Charakter von Tween 20 zurückzuführen sein. Geringe Mengen an Abbauprodukten in Form von freiem MSP waren zwar entstanden, wurden aber durch weitere Prozessierung während der Phagendisplayselektion gewaschen und konnten daher vernachlässigt werden.

Eine weitere Voraussetzung für die Durchführung einer Phagendisplayselektion ist die Immobilisierung des Zielproteins auf einer festen Oberfläche. Eine gerichtete Immobilisierung anhand eines Affinitätstags, in diesem Fall des His-Tags, war nicht möglich. Obwohl die Affinität des His₆-Tags an Ni-NTA sehr stark ist ($K_D = 14$ nM, Knecht *et al.*, 2009), konnten bR-beladenen Nanodiscs nicht an Ni-NTA-beschichtete Mikrotiterplatten gekoppelt werden. Da es allerdings möglich ist, bR-beladenen Nanodiscs via IMAC über Ni-NTA-Säulenmaterial zu reinigen, sollte der His-Tag am bR grundsätzlich zugänglich sein. Es wäre möglich, dass der His-Tag nicht vollständig zugänglich ist und dadurch durch das Tween 20 im Waschpuffer von der Oberfläche gelöst wird. Bereits geringe Mengen Tween 20 (0,005%) setzen die Bindung von Oligohistidinen an Ni-NTA stark herab (Knecht *et al.*, 2009). Leere Nanodiscs, in denen das MSP1 einen His-Tag trug, banden zum Teil an die Oberfläche. Der His-Tag an den Nanodiscs ist vermutlich etwas besser zugänglich als am bR. Es wäre denkbar, bR in Nanodiscs mit His-Tag einzubauen, um so eine Immobilisierung von bR-beladenen Nanodiscs auf Ni-NTA beschichtete Platten zu erreichen. Dies hätte allerdings zur Folge, dass der His-Tag am bR nicht mehr dazu genutzt werden kann, um beladene von unbeladenen Nanodiscs zu trennen. Da die Bindung der leeren Nanodiscs eher schwach ausgeprägt war, ist nicht auszuschließen, dass sich diese durch stärkeres Waschen von der Platte lösen würden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt ist es möglich, bR-beladene Nanodiscs kovalent auf Aminoplaten zu immobilisieren. Die Immobilisierung erfolgte über eine an einem Ethylenglycolabstandshalter angebrachte elektrophile Gruppe, die mit Nukleophilen wie freie Amine oder Thiole reagiert (Jensen *et al.*, 1996). Die Art des Abstandshalters und die Dichte der elektrophilen Gruppen auf der Oberfläche sind so konzipiert, dass sie für die Kopplung von Proteinen optimal sind. Bei bR-beladenen Nanodiscs kann die Kopplung über die lösungsmittelzugänglichen Lysinreste des bR (Abb. 19) und des MSP1 und über die N-Termini dieser Proteine erfolgen. Von Vorteil ist, dass sich aufgrund der kovalenten Bindung die bR-beladenen Nanodiscs, wenn sie einmal auf die Platte immobilisiert wurden, nicht wieder ablösen können.

4.2.2 Aus beiden Selektionen wurden bR-spezifische Klone isoliert

Die für die Selektionen gegen bR eingesetzte Peptidbibliothek bestand aus randomisierten 12-meren und einer Komplexität von $2,7 \times 10^9$.

Ein Anreicherungs-ELISA wurde durchgeführt, um den Erfolg der Selektionen abzuschätzen. Dabei wird die Bindung aller eluierten Phagen im Phagenpool nach jeder Selektionsrunde an das Zielprotein untersucht. Bei einer optimal verlaufenden Selektion ist zu erwarten, dass die Signalintensitäten vor der Selektion gering sind und dann mit jeder Selektionsrunde ansteigen, bis ein Plateau erreicht wird. Dies spiegelt die Anreicherung spezifisch bindender Phagen aus den Phagenpools mit jeder Selektionsrunde wieder. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass nach Amplifikation alle untersuchten Phagenpools ungefähr den gleichen Titer haben. In beiden Anreicherungs-ELISA (Abb. 17 und 20) fiel jedoch auf, dass die Signalintensitäten der amplifizierten Bibliothek vor Selektion sehr viel stärker waren als die der amplifizierten Phagengemische nach den Selektionsrunden. Für die Amplifikation der Phagenbibliothek wurden $1,5 \times 10^{10}$ Phagen aus der Bibliothek eingesetzt, während für die Amplifikation der eluierten Phagen nur zwischen 10^4 und 10^6 Phagen eingesetzt wurden. Daher ist es wahrscheinlich, dass der Titer des Phagengemisches vor Selektion deutlich höher war als die Titer der Phagengemische nach den einzelnen Selektionsrunden, wodurch die hohen Signalintensitäten bei Selektionsrunde 0 erklärt werden können. Es wurde deshalb eine so große Anzahl Phagen für die Amplifikation der Bibliothek eingesetzt, um die Komplexität der Bibliothek vor Selektion zu erhalten. Obwohl die Anreicherungs-ELISA zunächst nicht auf einen Erfolg der Selektionsrunden hindeuteten, waren aus den insgesamt 171 untersuchten Einzelklonen 106 Klone spezifisch für bR.

In der Selektion 1 deutete der Anreicherungs-ELISA eher auf eine Anreicherung von oberflächenbindenden Phagen hin (Abb. 17). Tatsächlich waren aber 61 % der analysierten Klone für bR spezifisch (Abb. 18). Die genaue Analyse der Klone zeigte, dass die oberflächenbindenden Phagen die höchsten Signalintensitäten im Assay zeigten (Abb. 18). Im Anreicherungs-ELISA wird nur die durchschnittliche Signalintensität aller sich im Phagenpool befindlichen Phagen dargestellt. Die Signalintensitäten sind dabei nicht gleichmäßig auf alle Phagenklone verteilt. Manche Phagenklone zeigen z. B. besonders hohe Signale, weil ihre Bindung besonders stark ist oder sie aufgrund von Selektionsvorteilen bei der Amplifikation häufiger im Phagenpool auftauchen. Da die oberflächenbindenden Phagen in Selektion 1 die höchsten Signale im ELISA lieferten, konnten sie trotz ihrer geringeren, individuellen Anzahl (21 %) die Signale der bR spezifischen Klone überdecken. Da außerdem die Zahl der Bindestellen für die oberflächenbindenden Phagen in den leeren Wells höher war als die Zahl der Bindestellen für bR-spezifische Phagen in Wells, die mit bR-beladenen Nanodiscs gekoppelt worden waren, konnten vielmehr Phagen an die Plattenoberfläche als an bR binden. Dadurch zeigten die oberflächenbindenden Phagen im Anreicherungs-ELISA stärkere Signale als die bR spezifischen Phagen.

Um die Anzahl der oberflächenbindenden Phagen noch weiter zu verringern, wurde Selektion 2 durchgeführt, in der freie Bindungsstellen durch Blocken abgesättigt wurden. Der zusätzliche Blockierungsschritt führte zwar zur Isolierung von weniger oberflächenbindenden Phagen, dafür aber zu einer Isolierung von mehr Bindern an leere Nanodiscs (Abb. 20 und 21).

Das Absättigen der Plattenoberfläche reduzierte die Bindung von oberflächenbindenden Phagen an die Platte und dadurch deren Anreicherung. Es wäre denkbar, dass die oberflächenbindenden Phagen möglicherweise mit einer stärkeren Affinität an die Platte binden als die Nanodisc spezifischen Phagen an die Nanodisc und dass die Bindung an die Plattenoberfläche eventuell zu einer sterischen Behinderung der Bindung an die Nanodisc führt. Dies zeigt, dass die Selektionsbedingungen entscheidend für die Bindungscharakteristika der isolierten Phagen sind.

In jeder Selektion wurden standardmäßig vier Selektionsrunden durchgeführt. Mehr Selektionsrunden wären unter Umständen notwendig gewesen, um eine deutliche Anreicherung hochaffiner Binder zu erreichen. Bei Selektion 2 ist zumindest eine Anreicherung zwischen der dritten und vierten Selektionsrunde zu sehen. Mit weiteren Selektionsrunden hätte die Anreicherung möglicherweise deutlicher werden können. Weitere Selektionsrunden hätten aber auch eine Anreicherung von unspezifischen Bindern zur Folge haben können. Welche Faktoren für eine Anreicherung spezifischer

Phagen entscheidend sind, muss meist empirisch festgestellt werden. Ist die Menge des eingesetzten Zielproteins gering, können durchaus mehr als vier Selektionsrunden nötig sein. Wie hoch die bR Menge in dem Well tatsächlich war, ist unklar. Die Nanodiscs nehmen viel Platz ein, wodurch die Kapazität des Wells schnell erreicht wird, obwohl die Menge des für die Phagenselektion zur Verfügung stehenden bR noch gering ist.

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Selektion ist das Vorhandensein von Epitopen auf der Oberfläche des Proteins. Für bR sind zwar keine natürlichen Peptid- oder Proteinliganden bekannt, dafür ist es aber möglich, monoklonale Antikörper gegen extramembrane Bereiche von bR zu erzeugen (Ovchinnikov *et al.*, 1984; Pashkov *et al.*, 2001). Da es sich bei den randomisierten Peptiden wie bei den monoklonalen Antikörpern auch um artifizielle Liganden handelt, erschien bR als ein geeignetes Zielprotein für die Selektion von Liganden. Tatsächlich wurden auch Liganden, die spezifisch für bR sind, isoliert.

4.2.3 Bakteriorhodopsin-spezifische Klone zeigten keine dominierende Aminosäuresequenz

Vor allem wenn Phagendisplayselektionen niedrigaffine Binder hervorbringen, ist es schwierig zu beurteilen, ob die selektierten Binder spezifisch für das Zielprotein sind. Peptide, die an andere Komponenten des Screening-Systems als dem Zielprotein binden, bezeichnet man als selektionsabhängige, zielproteinunabhängige Peptide (Menendez *et al.*, 2005). Eine andere Gruppe zielproteinunabhängiger Peptide sind vermehrungssabhängige Peptide, deren Selektion abhängig von der Vermehrungsrate mancher Phagenklone ist. Bestimmte Phagenklone können sich aufgrund von Mutationen schneller vermehren und so im Phagenpool überwiegen (Brammer *et al.*, 2007). Ihre mehrfache Selektion beruht daher nicht auf einer besonders starken Affinität zum Zielprotein, sondern auf dem Replikationsvorteil. Zahlreiche zielproteinunabhängige Peptide sind in der Literatur beschrieben worden (Vodnik *et al.*, 2011). Das Programm SAROTUP („Scanner And Reporter Of Target-Unrelated Peptides“) ermöglicht das Auffinden und Entfernen von zielproteinunabhängigen Peptiden aus den Ergebnissen der Phagendisplayselektionen (Huang *et al.*, 2010). Die Peptidsequenzen der bR spezifischen Klone wurden in das Tool „TUPscan“ des Programms SAROTUP geladen. Keine der eingeladenen Sequenzen zeigten Motive aus bekannten zielproteinunabhängigen Peptiden. Das bedeutet nicht, dass es sich bei den selektierten Peptiden keinesfalls um zielproteinunabhängige Peptide handelt,

sondern dass lediglich keine bekannten zielproteinunabhängigen Peptide mit den selektierten Sequenzen existieren.

Die exponierten Peptide der analysierten bR-spezifischen Klone zeigten kein Konsensusmotiv bzw. keine dominierende Aminosäuresequenz. In Selektion 1 tauchte lediglich eine Sequenz siebenmal auf. Ansonsten waren alle Sequenzen nur ein- oder zweimal vorhanden. Das wiederholte Auftauchen von Sequenzen ist keine Voraussetzung für eine erfolgreiche Selektion. Sequenzen können nicht nur aufgrund von spezifischer Anreicherung sondern auch aufgrund von Vermehrungsvorteilen der entsprechenden Phagen häufiger isoliert werden. Auf den ersten Blick schien keine Präferenz für einzelne Aminosäuren erkennbar. Gruppen von zwei bis drei gleichen, aufeinander folgenden Aminosäuren tauchten häufig in mehreren Sequenzen auf (Abb. 19 und 22). Einige Sequenzen, wie z. B. 156 und 196 oder 151 und 209, waren sich in auffällig vielen einzelnen Aminosäuren ähnlich. Es wäre möglich, dass die Sequenzen erst den Beginn der Selektion eines oder einiger Konsensusmotive beschreiben. Wäre die Selektion fortgeführt worden, hätten sich vielleicht einige dominierende Aminosäuresequenzen abgezeichnet.

4.2.4 Nanodisc-spezifische Klone enthielten ein bekanntes Motiv

Auffällige Ähnlichkeiten zeigten die Peptide der vier untersuchten Nanodisc-spezifischen Klone bezüglich der ersten drei Aminosäuren (KVW oder KLW). Einige Peptide von vermeintlichen bR spezifischen Klonen wiesen sowohl am Anfang als auch innerhalb der Peptidsequenz ebenfalls die Aminosäureabfolge KVW auf.

Eine Literaturrecherche und eine Abfrage über das Programm SAROTUP ergaben, dass das Motiv K(L/V)WX(I/L/V)P, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht, ein in Phagendisplayselektionen häufig auftretendes Motiv ist. Die Klone 39 und 65 besaßen genau dieses Motiv, während die Klone 1, 22, 77, 64 und 67 diesem Motiv bis auf dem Prolin am Schluss entsprachen. Gleiche oder ähnliche Sequenzen wurden aus verschiedenen Screenings der Ph.D.TM-12 und Ph.D.TM-7 Bibliothek von New England Biolabs gegen unterschiedliche Zielproteine wie der Lipoproteinlipase, Interleukin-6, *E. coli* FtsA oder gegen Hitzeschockproteine aus der Mungobohne selektiert (Vodnik *et al.*, 2011; Mizuguchi *et al.*, 2000; Carettoni *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). Da Peptide mit dem Motiv K(L/V)WX(I/L/V)P aus beiden Bibliotheken isoliert wurden, ist ein Vermehrungsvorteil der entsprechenden Phagenklone unwahrscheinlich, denn dies würde eine unabhängige Mutation beider Phagenklone aus den beiden Bibliotheken voraussetzen. Eventuell stellt dieses Motiv ein Epitop dar, dass von mehreren, nicht miteinander verwandten Proteinen geteilt wird. Eine Selektionsabhängigkeit dieser Sequenz ist ebenfalls nicht auszuschließen, da

Bhunia *et al.* (2008) ein Peptid konstruiert haben, welches Ähnlichkeiten zu K(L/V)WX(I/L/V)P hat und an *E. coli* Lipopolysaccharid (LPS), genauer gesagt an das Lipid A, bindet. LPS formt zusammen mit einer Phospholipidschicht die asymmetrische Lipiddoppelschicht der äußeren Membran gram-negativer Bakterien (Raetz *et al.*, 2002). Verunreinigungen aufgrund von LPS-Rückständen konnten in Phagenpräparationen nachgewiesen werden (Zakharova *et al.*, 2005) und es wird vermutet, dass diese Verunreinigungen der Grund für die häufige Selektion dieses Motivs sind (Vodnik *et al.*, 2011).

Eine andere Möglichkeit ist aber, dass in dieser Arbeit LPS-Rückstände über die Präparation des MSP1 oder über das auf *E. coli*-basierte Kit zur zellfreien Proteinsynthese (Merk *et al.*, 2012) in die Phagenselektion gekommen sein könnte. Generell kann LPS aus Proteinen, welche aus *E. coli* gereinigt wurden, nicht über IMAC oder Größenausschlusschromatographie entfernt werden, da dafür Ionentauscher, die das LPS über seine negative Ladung binden, und spezielle Säulen zur Entfernung von LPS nötig sind (Petsch und Birger Anspach, 2000). Das Lipoprotein MSP1 zieht vermutlich Lipide aufgrund seiner amphipathischen Eigenschaften aus dem Expressionswirt an. Denkbar wäre, dass *E. coli*-Lipide mit in die Nanodiscs eingebaut werden und so von Phagen, welche Peptide mit dem Motiv K(L/V)WX(I/L/V)P präsentieren, gebunden werden.

Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die isolierten Peptide mit dem Motiv K(L/V)WX(I/L/V)P gezielt an Nanodiscs binden. Das Phospholipid DMPC, das in die Nanodiscs eingebaut wurde, und das Lipid A aus *E. coli* sind amphipathische Makromoleküle, welche aus Fettsäuren und einer hydrophilen Kopfgruppe bestehen (Abb. 25). Bei DMPC besteht die Kopfgruppe aus einem Phosphotidylcholin und beim Lipid A aus einem Disaccharid, das aus N-Acetylglucosaminphosphaten besteht. Da sich beide Moleküle nur in den hydrophilen Kopfgruppen unterscheiden, aber sonst in ihrer Natur ähnliche Eigenschaften aufweisen, könnte dies dafür sprechen, dass die isolierten Peptide keine selektionsabhängige Binder sind, die auf LPS-Verunreinigungen zurückzuführen sind, sondern spezifisch an das DMPC der Nanodiscs binden. Da auch ähnliche Sequenzen in den bR spezifischen Klonen gefunden wurden, wäre es denkbar, dass diese Klone sowohl an die Membran als auch an das bR binden. Da dies jedoch nicht weiter überprüft wurde, wurden diese Klone nicht in den weiteren Experimenten berücksichtigt.

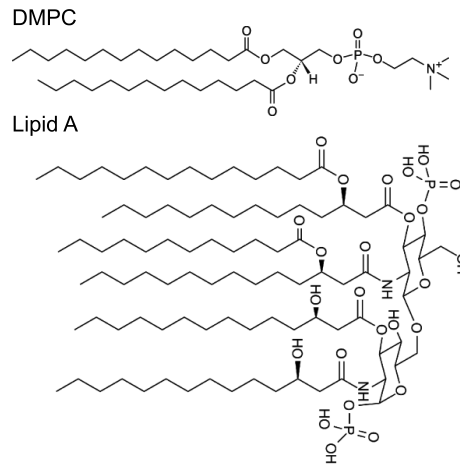


Abb. 25 Strukturformeln von 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) und Lipid A aus *E. coli*. DMPC besteht aus einem Phosphatidylcholin, das mit zwei Fettsäuren verestert ist. Lipid A aus *E. coli* besteht aus sich wiederholenden N-Acetylglucosaminphosphateinheiten, welche mit Fettsäuren verestert sind.

4.2.5 Optimierungsvorschläge für Phagendisplayselektionen gegen Zielproteine in Nanodiscs

Die in dieser Arbeit durchgeführten Phagendisplayselektionen führten zwar zu spezifischen Bindern gegen das Zielprotein bR, allerdings besteht Optimierungsbedarf, um die Anreicherung der Binder während den Selektionsrunden zu verbessern. Eine Anreicherung erhöht die Wahrscheinlichkeit auf die Selektion hochaffiner Binder, da die Anreicherung voraussetzt, dass sich diese Binder im Phagenpool gegenüber anderen Bindern aufgrund ihrer starken Bindung zum Zielprotein durchgesetzt haben. Im Falle des Phagendisplay gegen bR-beladene Nanodiscs wurden vermutlich eher moderat affine Binder isoliert. Optimierungen in der Selektionsstrategie können eine bessere Anreicherung und die Selektion von hoch affinen Bindern begünstigen.

In Selektion 1 kam es zur Anreicherung von oberflächenbindenden Phagen, die in den ELISA-Analysen hohe Signalintensitäten zeigten, wohingegen in Selektion 2 die Selektion oberflächenbindender Phagen durch das Absättigen der Plattenoberfläche reduziert wurden. Allerdings wurden dann mehr Phagenklone isoliert, die gegen die Nanodisc gerichtet waren. Daher wäre eine Vorinkubation des einzusetzenden Phagenpools mit leeren Nanodiscs vor jeder Selektionsrunde sinnvoll, um Phagen aus dem Pool zu entfernen, die leere Nanodiscs binden. In Kombination mit dem Blockieren der Oberfläche sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, auf spezifische Binder zu selektieren. Elution der Phagen mit einem bekannten Liganden des

Zielproteins würde auch zu einer Vermeidung der Isolierung unspezifischer Binder führen. Da allerdings für bR keine extramembranen Liganden bekannt sind, ist dies für diese Selektion nicht möglich gewesen.

Die erfolgreiche Selektion von Liganden aus Phagendisplayselektionen ist häufig abhängig vom Zielprotein. Seine Konzentration kann entscheidend für die Anreicherung sein. Ist die Konzentration zu gering, kann sich die Anzahl der selektierten spezifischen Phagenklone nach einer Selektionsrunde während der Amplifikation keinen Vorteil gegenüber den unspezifischen Phagenklonen verschaffen und so nicht angereichert werden. Vor allem für Binder mit geringer Affinität gegenüber dem Zielprotein ist die Konzentration des Zielproteins von entscheidender Rolle (Kretzschmar *et al.*, 1994). Je größer das Zielprotein ist, desto weniger Bindestellen sind für die Phagenselektion verfügbar. Es ist denkbar, dass die Konzentration des dargebotenen Zielproteins bR aufgrund der Masse der Nanodiscs, obwohl die maximale Menge immobilisiert wurde, während den Selektionsrunden zu gering war. Die Konzentration des Zielproteins für die Selektion könnte erhöht werden, indem es auf einer größeren Fläche angeboten wird. Die Anwendung von 5 ml Immuntubes in Verbindung mit minimalen Reaktionsvolumina führte in der Vergangenheit zu guten Ergebnissen in Phagendisplayselektionen (Kretzschmar *et al.*, 1994) bezüglich der Anreicherung von anfangs noch moderat affinen Phagen.

In dieser Arbeit wurde eine Phagenbibliothek verwendet, welche 12-mer Peptide präsentiert. Ein Vorteil von Peptidbibliotheken ist außer ihrer meist hohen Komplexität, dass sich Konsensusmotive ableiten lassen. Es wäre allerdings möglich, dass sich über andere Bibliotheken affinere Liganden anreichern lassen. Antikörperbasierte Bibliotheken, welche beispielsweise Fab-Fragmente oder scFv's präsentieren, wären eine mögliche Alternative. Zumindest existieren Antikörper gegen bR (Ovchinnikov *et al.*, 1984; Yamaguchi *et al.*, 1993; Pashkov *et al.*, 2001), während keine Peptidliganden für bR bekannt sind. Ob der Einsatz einer antikörperbasierten Bibliothek zu mehr Erfolg führen würde, kann allerdings nur empirisch nachgewiesen werden.

Der einzige natürlich vorkommende Ligand des bR ist das Retinal. Protein- oder Peptidliganden sind nicht bekannt, obwohl Interaktionspartner aufgrund der Membranlokalisation zu erwarten wären. Das natürliche Habitat von *Halobacterium salinarum* sind salzreiche Gewässer. Damit die Proteine nicht unter diesen Bedingungen denaturieren, bestehen sie vorrangig aus sauren Aminosäuren (Fukuchi *et al.*, 2003). Der isoelektrische Punkt von bR liegt beispielsweise bei 4,6, sodass vielleicht kaum potentielle Interaktionspartner unter diesen Bedingungen existieren und sich das Protein während der Evolution gegen Interaktionspartner

entwickelt hat. Eine Anpassung der Selektionsbedingungen an die hohen Salzkonzentrationen der natürlichen Umgebung des bR hätte möglicherweise die Selektion von Liganden begünstigt. Allerdings würden solch hohe Salzkonzentrationen die Stabilität der Nanodiscs auf Dauer beeinflussen. Andere Proteine wie z. B. GPCRs, die schon über natürliche Interaktionspartner verfügen bzw. auf ihrer Oberfläche Bindetaschen für Interaktionen anbieten, könnten möglicherweise zu mehr hochaffinen Peptidliganden führen. Ziel dieser Arbeit war jedoch, bR aufgrund seiner vielen Loopregionen als Modellsystem für ein polytopisches Transmembranprotein zu verwenden und anhand diesem die Eignung von in Nanodiscs inkorporierten Membranproteinen für Phagendisplayselektionen zu untersuchen. Da aus der Phagenbibliothek Liganden isoliert wurden, die an die Loopregionen binden, wurde dieses Ziel erreicht.

4.3 DIE SELEKTIERTEN LIGANDEN BANDEN EIN NICHT-LINEARES EPITOP VON BAKTERIORHODOPSIN

Die Bindung von drei bR-spezifischen Klonen an extramembrane Bereiche von bR wurde mit Hilfe von synthetischen Peptiden bestätigt. Die synthetischen Peptide deckten alle Bereiche von bR ab, die sich außerhalb der Membran befanden, wodurch eine Epitopkartierung möglich war. Die Analyse der Epitopkartierung ergab, dass die Phagen an intrazelluläre Loops von bR binden. Eine Bindung an die Loops AB und EF war zu beobachten, aber nicht an Loop CD, welcher sich ebenfalls auf der intrazellulären Seite des Proteins befindet. Die Loops AB und EF sind beide größer und ragen weiter aus der Membran hervor, während der Loop CD, der zwischen den beiden liegt, kaum lösungsmittelzugänglich ist (Abb. 26). Da die Loops AB und EF den Loop CD überragen, könnten diese für Interaktionen mit Liganden auf der intrazellulären Seite bevorzugt werden.

Die selektierten Peptide binden demnach gleichzeitig an zwei Epitope des Zielproteins. Anhand der Kristallstruktur von bR konnten die Abstände zwischen Loop AB und EF berechnet werden (Abb. 26) und betrugen zwischen 1,3 nm und 2,2 nm. Ein 12-mer Peptid hat im unstrukturierten Zustand eine Länge von 4,2 nm, d. h. selbst wenn die Peptide nicht vollständig ausgestreckt wären, wären sie in der Lage beide Loops gleichzeitig abzudecken.

In der Kristallstruktur ist zwischen Loop AB und Loop EF ein Teil des C-Terminus zu sehen. Obwohl der C-Terminus von bR mit seinen 25 Aminosäuren relativ lang ist und daher als mögliches Epitop wahrscheinlich wäre, zeigte er keinerlei Interaktion in der

Epitopkartierung. NMR-Experimente haben gezeigt, dass der erste Teil der C-Terminus von der Membran festgehalten wird, während der Teil ab dem Prolin an Position 236 frei beweglich ist (Engelhard *et al.*, 2006). Das bedeutet, dass der Teil des C-Terminus, der sich in der Kristallstruktur zwischen Loop AB und Loop EF befindet, in einer physiologischen Umgebung aufgrund seiner Flexibilität nicht zwangsläufig dort lokalisiert sein muss. Eine Deletion des gesamten C-Terminus führt zu Störungen in der Protonenaufnahme des Proteins, während eine Deletion ab dem Pro236 lediglich Einbußen in der Stabilität zur Folge hat (Turner *et al.*, 2008). Möglicherweise ist der C-Terminus aufgrund der Flexibilität der endständigen Aminosäuren nicht als Epitop für die Interaktion mit wasserlöslichen Liganden geeignet.

Da das identifizierte Epitop aus zwei im Protein nicht miteinander verbundenen Bereichen besteht, kann man darauf schließen, dass die Loops AB und EF ein nicht lineares, diskontinuierliches Epitop für die Bindung der isolierten Liganden darstellen.

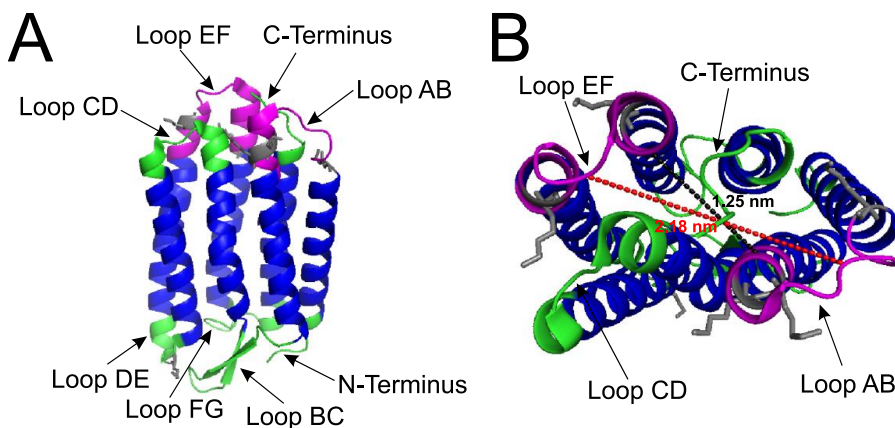


Abb. 26 Kristallstruktur von bR (PDB: 1IW6). **A:** Seitenansicht von bR. **B:** Ansicht von oben. Transmembranbereiche sind blau eingefärbt, extramembrane Bereiche sind in grün und lila dargestellt. Putative Bindestelle für die Phagenklone 43, 68 und 165 sind in lila hervorgehoben. Gestrichelte Linien in B) zeigen Abstände zwischen Aminosäuren der Loops AB und EF: Die schwarz gestrichelte Linie zeigt den Abstand zwischen den Aminosäuren A38 und V167 (1,25 nm) und die rot gestrichelte Linie zwischen den Aminosäuren V34 und M163 (2,18 nm). Lysinreste und die Ausrichtung ihrer Seitenketten sind in grau angezeigt. Die Visualisierung der bR-Struktur erfolgte über das Programm pymol.

Auffällig war, dass alle drei untersuchten Klone, das gleiche Epitop auf der intrazellulären Seite banden. Es kann ausgeschlossen werden, dass die extrazelluläre Oberfläche des bR aufgrund der gewählten Immobilisierungsstrategie für die Phagenselektion nicht zur Verfügung stand. Die Immobilisierung der bR-beladenen Nanodiscs erfolgte anhand von kovalenter Kopplung über Lysinseitenketten. Es gibt

fünf Lysinreste auf der intrazellulären Seite in den Loops AB und EF und nur eines auf der extrazellulären Seite im Loop DE. Die Ausrichtung der Lysinseitenketten ist in der bR-Struktur in Abb. 26 dargestellt. Daran ist zu sehen, dass die Seitenketten in die umstehende Flüssigkeit ragen und daher gut zugänglich sein müssten. Ob die Seitenkette eines bestimmten Lysins für die Kopplung an die Oberfläche bevorzugt wird, ist anhand dieser Darstellung nicht ersichtlich. Die meisten Lysine (18) befinden sich ohnehin im MSP1 der Nanodiscs und da es möglich ist, leere Nanodiscs ohne große Schwierigkeiten auf die Aminoplaten zu immobilisieren, sind zweifelsohne einige dieser Lysinseitenketten für die Immobilisierung zugänglich. Die Immobilisierung der bR-beladenen Nanodiscs findet wahrscheinlich zufällig in Bezug auf ihre Orientierung statt, sodass keine Seite des Proteins für die Phagenselektion favorisiert wurde.

Es kann nur darüber spekuliert werden, warum keine Binder gegen die extrazelluläre Oberfläche selektiert wurden. Obwohl sich bR in *Halobacterium salinarum* zu einer lichtgetriebenen Protonenpumpe entwickelte und auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, besitzt es dennoch keine Funktion als Rezeptor. Es wäre denkbar, dass die Evolution der extrazellulären Seite von bR gegen die Ausbildung von Bindetaschen gerichtet war.

4.4 RELEVANZ

Trotz immer weiter entwickelter Technik stellt das Arbeiten mit Membranproteinen immer noch eine Herausforderung dar. Viele der für die Untersuchung von löslichen Proteinen selbstverständlichen Techniken können meist nicht ohne Weiteres für Membranproteine übernommen werden. Es wurden viele Anstrengungen unternommen, um Membranproteine in Phagendisplayselektionen zu nutzen (Molek *et al.*, 2011).

Dennoch ist die Anzahl der durchgeführten Phagendisplayselektionen gegen Membranproteine deutlich geringer als gegen lösliche Proteine. Die Hauptproblematik liegt in der Präparation der Membranproteine und der Einhaltung des physiologischen Zustandes der Proteine. Der Einsatz von Nanodiscs als Membranumgebung führt zu einem fast physiologischen und stabilen Zustand für das Zielprotein. Zelfreie Expression des Membranproteins und sein gleichzeitiger Einbau in leere, vorgeformte Nanodiscs erlaubt eine schnelle und universelle Präparation des Membranproteins. Obwohl zelfreie Expression im Vergleich zur Expression in Zellen nur geringe Ausbeuten liefert, sind diese Mengen ausreichend für die Durchführung einer gesamten Phagendisplayselektion und nachfolgender Analyse. In dieser Arbeit waren nur 500 µg Zielprotein notwendig für die Durchführung der Selektionsrunden und der

Analyse von 171 einzelnen Phagenklonen. Diese Menge konnte leicht aus einer 1 ml Reaktion des verwendeten Kits zur zellfreien Proteinsynthese gewonnen werden.

Insgesamt erlaubt die Kombination aus zellfreier Proteinsynthese und Phagendisplay mit Membranproteinen in Nanodiscs ein schnelles Screening von Phagenbibliotheken gegen Membranproteine. Diese Methodik kann leicht auf verschiedene Ziellmembranproteine übertragen werden. Die Art der Bibliothek spielt dabei keine Rolle. In dieser Arbeit wurde eine Peptidbibliothek verwendet, aus der erste Peptidliganden gegen bR isoliert wurden. Statt der Peptidbibliothek hätte auch eine antikörperbasierten Bibliothek verwendet werden können. Peptidbibliotheken eignen sich gut zur Entdeckung neuartiger, pharmakologisch aktiver Agonisten oder Antagonisten von Rezeptoren. Allerdings sind die Bindeaffinitäten der isolierten Peptide oft zu gering, um einen therapeutischen Nutzen zu erreichen (Nilsson *et al.*, 2000). Die aus dem Phagendisplay isolierten Peptide können aber als Grundlage für weitere Maturierung genutzt werden. Verbesserte Versionen der Peptide können beispielsweise aus Phagenbibliotheken, welche aus zahlreichen, randomisiert mutierten Versionen der Ursprungspeptide bestehen, gewonnen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Nanodiscs inkorporierte Membranproteine direkt als Zielproteine für Phagendisplayselektionen eingesetzt werden können und dass es möglich ist, Liganden zu identifizieren, welche nicht-lineare Epitope binden. Dadurch kann der Einsatz von Membranproteinen im Phagendisplay vereinfacht werden und das Repertoire der Methoden, die auf Membranproteine angewendet werden, erweitert werden. Da Membranproteine die größte Zielgruppe von pharmazeutischen Wirkstoffen darstellen, ist dieser Ansatz ein wichtiger Beitrag zur Entwicklung von Pharmazeutika.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Membranproteine sind an einer ganzen Reihe von zellulären Prozessen beteiligt. Sie führen wichtige Funktionen im Transport von Substanzen, in der Signaltransduktion und der Generierung von Energie, in metabolischen Reaktionen und vielem mehr aus. In der pharmazeutischen Industrie spielen Membranproteine eine besondere Rolle, da sie die Zielmoleküle von 60 % aller pharmakologischer Wirkstoffe darstellen (Overington *et al.*, 2006). Die Identifizierung von Liganden, die die Aktivität von Membranproteinen modulieren können, ist daher ein wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung von neuartigen Pharmazeutika.

Phagendisplay ist eine effektive Methode, um Peptide zu selektieren, die spezifisch an ein Zielprotein binden, indem Peptidbibliotheken eingesetzt werden, die auf der Oberfläche von Phagen präsentiert werden (Smith, 1985). Die Anwendung von Phagendisplayselektionen auf Membranproteine als Zielproteine stellt jedoch eine Herausforderung dar, da Membranproteine aufgrund der starken Hydrophobizität ihrer Transmembrandomänen die Integration in eine Membranumgebung benötigen. Eine Membranumgebung ist auch notwendig, um die korrekte Faltung und Epitopbildung des Proteins zu gewährleisten.

In dieser Arbeit wurde Bakteriorhodopsin (bR) als Modell eines polytopischen Transmembranproteins als Zielprotein für das Screening einer Phagenbibliothek nach potentiellen Liganden verwendet. Es wurden zum ersten Mal Nanodiscs als Modellmembranen in einer Phagendisplayselektion eingesetzt. Nanodiscs bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, die durch zwei Kopien eines Gerüstproteins umgeben ist, und zeichnen sich gegenüber anderen Modellmembranen durch hohe Stabilität und Homogenität aus. Die Expression von bR erfolgte in dieser Arbeit über zellfreie Proteinsynthese in Gegenwart leerer vorgeformter Nanodiscs. Der Einbau von bR in Nanodiscs fand kotranslational statt und wurde über Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie nachgewiesen. Die korrekte Faltung und Funktionalität von bR wurde über ein Absorptionsspektrum anhand des für bR charakteristischen Absorptionsmaximums verifiziert. Das Screening einer Phagenbibliothek aus randomisierten 12-mer Peptiden gegen in Nanodiscs inkorporiertes bR führte zur Isolierung von Phagenklonen, die bR spezifisch banden. Über eine Epitopkartierung konnten der Loop AB und der Loop EF von bR als diskontinuierliche Bindungsstelle für die selektierten Phagenklone identifiziert werden.

6 SUMMARY

Membrane proteins play a role in a variety of cellular processes. They are involved in the transport of substances across the membrane, in signal transduction, energy generation, metabolic reactions and much more. Membrane proteins are of special interest in the pharmaceutical industry, since 60 % of all clinical drugs target membrane proteins (Overington *et al.*, 2006). Identifying ligands that modulate the activity of membrane proteins is of great interest in the development of novel pharmaceuticals.

Phage display is an effective method for the selection of peptides binding specifically a target protein by using peptide libraries displayed on the surface of phage (Smith, 1985). The use of membrane proteins in phage display selections, however, is a challenge, since membrane proteins require due to the strong hydrophobicity of their transmembrane regions a membrane environment. Additionally, a membrane environment is necessary to retain correct folding and epitope formation of the protein.

In this work, bacteriorhodopsin (bR) as a model of a polytopic membrane protein was used as target to screen a phage library for potential ligands. Nanodiscs were used for the first time as a model membrane in a phage display selection. Nanodiscs consist of a lipid bilayer encircled by two copies of a membrane scaffold protein and show compared to other model membranes high stability and homogeneity. In this work, expression of bR was achieved in a cell-free protein synthesis approach in the presence of empty preformed nanodiscs. Insertion of bR into the nanodiscs occurred cotranslationally and was proven by affinity and size exclusion chromatography. Correctly folded and functionally active bR was verified by an absorbance spectrum due to the bR characteristic absorbance maximum. Screening a 12-mer phage display peptide library against bR incorporated into nanodiscs led to the isolation of phage clones binding specifically to bR. Epitope mapping revealed that the loop AB and EF of bR form a discontinuous binding site for the binding of the selected phage clones.

7 LITERATUR

1. Arap, W., M. G. Kolonin, M. Trepel, J. Lahdenranta, M. Cardo-Vila, R. J. Giordano, P. J. Mintz, P. U. Ardel, V. J. Yao, C. I. Vidal, L. Chen, A. Flamm, H. Valtanen, L. M. Weavind, M. E. Hicks, R. E. Pollock, G. H. Botz, C. D. Bucana, E. Koivunen, D. Cahill, P. Troncoso, K. A. Baggerly, R. D. Pentz, K. A. Do, C. J. Logothetis, and R. Pasqualini. 2002. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat Med* **8**:121-127.
2. Bannwarth, M., and G. E. Schulz. 2003. The expression of outer membrane proteins for crystallization. *Biochim Biophys Acta* **1610**:37-45.
3. Bayburt, T. H., Y. V. Grinkova, and S. G. Sligar. 2006. Assembly of single bacteriorhodopsin trimers in bilayer nanodiscs. *Arch Biochem Biophys* **450**:215-222.
4. Bayburt, T. H., Y. V. Grinkova, and S. G. Sligar. 2002. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett* **2**:853-856.
5. Bayburt, T. H., and S. G. Sligar. 2010. Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett* **584**:1721-1727.
6. Bayburt, T. H., and S. G. Sligar. 2003. Self-assembly of single integral membrane proteins into soluble nanoscale phospholipid bilayers. *Protein Sci* **12**:2476-2481.
7. Bhunia, A., G. L. Chua, P. N. Domadia, H. Warshakoon, J. R. Cromer, S. A. David, and S. Bhattacharjya. 2008. Interactions of a designed peptide with lipopolysaccharide: Bound conformation and anti-endotoxic activity. *Biochem Biophys Res Commun* **369**:853-857.
8. Bikker, J. A., S. Trumpf-Kallmeyer, and C. Humblet. 1998. G-Protein coupled receptors: models, mutagenesis, and drug design. *J Med Chem* **41**:2911-2927.
9. Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-1523.
10. Borch, J., and T. Hamann. 2009. The nanodisc: a novel tool for membrane protein studies. *Biol Chem* **390**:805-814.
11. Borch, J., F. Torta, S. G. Sligar, and P. Roepstorff. 2008. Nanodiscs for immobilization of lipid bilayers and membrane receptors: kinetic analysis of cholera toxin binding to a glycolipid receptor. *Anal Chem* **80**:6245-6252.
12. Bowie, J. U. 2001. Stabilizing membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* **11**:397-402.
13. Brammer, L. A., B. Bolduc, J. L. Kass, K. M. Felice, C. J. Noren, and M. F. Hall. 2008. A target-unrelated peptide in an M13 phage display library traced to an advantageous mutation in the gene II ribosome-binding site. *Anal Biochem* **373**:88-98.
14. Bratkovic, T. 2010. Progress in phage display: evolution of the technique and its application. *Cell Mol Life Sci* **67**:749-767.
15. Breyton, C., B. Pucci, and J. L. Popot. 2010. Amphipols and fluorinated surfactants: Two alternatives to detergents for studying membrane proteins in vitro. *Methods Mol Biol* **601**:219-245.

16. **Breyton, C., C. Tribet, J. Olive, J. P. Dubacq, and J. L. Popot.** 1997. Dimer to monomer conversion of the cytochrome b6 f complex. Causes and consequences. *J Biol Chem* **272**:21892-21900.
17. **Brotherus, J. R., P. C. Jost, O. H. Griffith, and L. E. Hokin.** 1979. Detergent inactivation of sodium- and potassium-activated adenosinetriphosphatase of the electric eel. *Biochemistry* **18**:5043-5050.
18. **Brouillette, C. G., R. B. McMichens, L. J. Stern, and H. G. Khorana.** 1989. Structure and thermal stability of monomeric bacteriorhodopsin in mixed phospholipid/detergent micelles. *Proteins* **5**:38-46.
19. **Cappuccio, J. A., C. D. Blanchette, T. A. Sulchek, E. S. Arroyo, J. M. Kralj, A. K. Hinz, E. A. Kuhn, B. A. Chromy, B. W. Segelke, K. J. Rothschild, J. E. Fletcher, F. Katzen, T. C. Peterson, W. A. Kudlicki, G. Bench, P. D. Hoeprich, and M. A. Coleman.** 2008. Cell-free co-expression of functional membrane proteins and apolipoprotein, forming soluble nanolipoprotein particles. *Mol Cell Proteomics* **7**:2246-2253.
20. **Carettoni, D., P. Gomez-Puertas, L. Yim, J. Mingorance, O. Massidda, M. Vicente, A. Valencia, E. Domenici, and D. Anderluzzi.** 2003. Phage-display and correlated mutations identify an essential region of subdomain 1C involved in homodimerization of *Escherichia coli* FtsA. *Proteins* **50**:192-206.
21. **Chen, Y. J., M. F. Wu, Y. H. Yu, M. F. Tam, and T. Y. Lin.** 2004. Developmental expression of three mungbean Hsc70s and substrate-binding specificity of the encoded proteins. *Plant Cell Physiol* **45**:1603-1614.
22. **Civjan, N. R., T. H. Bayburt, M. A. Schuler, and S. G. Sligar.** 2003. Direct solubilization of heterologously expressed membrane proteins by incorporation into nanoscale lipid bilayers. *Biotechniques* **35**:556-560, 562-553.
23. **Clackson, T., and H. B. Lowman.** 2004. Phage display : a practical approach. Oxford University Press, Oxford.
24. **Cohen, S. N., A. C. Chang, and L. Hsu.** 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**:2110-2114.
25. **Cooper, G. M.** 2000. The cell : a molecular approach, 2nd ed. ASM Press ;Sinauer Associates, Washington, D.C.Sunderland, Mass.
26. **Dalglish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-767.
27. **De Berardinis, P., and N. L. Haigwood.** 2004. New recombinant vaccines based on the use of prokaryotic antigen-display systems. *Expert Rev Vaccines* **3**:673-679.
28. **Dencher, N. A., K. D. Kohl, and M. P. Heyn.** 1983. Photochemical cycle and light-dark adaptation of monomeric and aggregated bacteriorhodopsin in various lipid environments. *Biochemistry* **22**:1323-1334.
29. **Deng, L. W., P. Malik, and R. N. Perham.** 1999. Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of *Escherichia coli*. *Virology* **253**:271-277.

30. **Denisov, I. G., Y. V. Grinkova, A. A. Lazarides, and S. G. Sligar.** 2004. Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J Am Chem Soc* **126**:3477-3487.
31. **Denisov, I. G., M. A. McLean, A. W. Shaw, Y. V. Grinkova, and S. G. Sligar.** 2005. Thermotropic phase transition in soluble nanoscale lipid bilayers. *J Phys Chem B* **109**:15580-15588.
32. **Deperthes, D.** 2002. Phage display substrate: a blind method for determining protease specificity. *Biol Chem* **383**:1107-1112.
33. **Dong, J., W. Q. Liu, A. M. Jiang, K. J. Zhang, and M. Q. Chen.** 2008. A novel peptide, selected from phage display library of random peptides, can efficiently target into human breast cancer cell. *Chinese Sci Bull* **53**:860-867.
34. **Drew, D., L. Froderberg, L. Baars, and J. W. de Gier.** 2003. Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1610**:3-10.
35. **Engelhard, M., S. Finkler, G. Metz, and F. Siebert.** 1996. Solid-state ^{13}C -NMR of [(3- ^{13}C)Pro]bacteriorhodopsin and [(4- ^{13}C)Pro]bacteriorhodopsin: evidence for a flexible segment of the C-terminal tail. *Eur J Biochem* **235**:526-533.
36. **Engvall, E., and P. Perlmann.** 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**:871-874.
36. **Fernandez-Gacio, A., M. Uguen, and J. Fastrez.** 2003. Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends Biotechnol* **21**:408-414.
37. **Fukuchi, S., K. Yoshimune, M. Wakayama, M. Moriguchi, and K. Nishikawa.** 2003. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *J Mol Biol* **327**:347-357.
38. **Glück, J.** 2006. Identifizierung und Charakterisierung artifizieller SH3-Liganden. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
39. **Glück, J. M., B. W. Koenig, and D. Willbold.** 2011. Nanodiscs allow the use of integral membrane proteins as analytes in surface plasmon resonance studies. *Anal Biochem* **408**:46-52.
40. **Glück, J. M., M. Wittlich, S. Feuerstein, S. Hoffmann, D. Willbold, and B. W. Koenig.** 2009. Integral membrane proteins in nanodiscs can be studied by solution NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* **131**:12060-12061.
41. **Gohon, Y., and J. L. Popot.** 2003. Membrane protein-surfactant complexes. *Curr Opin Colloid In* **8**:15-22.
42. **Grigorieff, N., T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin, and R. Henderson.** 1996. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J Mol Biol* **259**:393-421.
43. **Grinkova, Y. V., I. G. Denisov, and S. G. Sligar.** 2010. Engineering extended membrane scaffold proteins for self-assembly of soluble nanoscale lipid bilayers. *Protein Eng Des Sel* **23**:843-848.
44. **Hagn, F., M. Etzkorn, T. Raschle, and G. Wagner.** 2013. Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. *J Am Chem Soc* **135**:1919-1925.

45. **Haupts, U., J. Tittor, and D. Oesterhelt.** 1999. Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**:367-399.
46. **Hawinkels, L. J., S. M. van Rossenberg, E. S. de Jonge-Muller, T. J. Molenaar, C. C. Appeldoorn, T. J. van Berkel, C. F. Sier, and E. A. Biessen.** 2007. Efficient degradation-aided selection of protease inhibitors by phage display. *Biochem Biophys Res Commun* **364**:549-555.
47. **Hoogenboom, H. R.** 2002. Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol Biol* **178**:1-37.
48. **Hosea, N. A., and F. P. Guengerich.** 1998. Oxidation of nonionic detergents by cytochrome P450 enzymes. *Arch Biochem Biophys* **353**:365-373.
49. **Huang, J., B. Ru, S. Li, H. Lin, and F. B. Guo.** 2010. SAROTUP: scanner and reporter of target-unrelated peptides. *J Biomed Biotechnol* **2010**:101932.
50. **Jensen, S. P., S. E. Rasmussen, and M. H. Jakobsen.** 1996. Photochemical Coupling of Peptides to Polystyrene Micro Well Plates. *Innovations & Perspectives in Solid Phase Synthesis & Combinatorial Chemical Libraries.*
51. **Jung, S., A. Honegger, and A. Pluckthun.** 1999. Selection for improved protein stability by phage display. *J Mol Biol* **294**:163-180.
52. **Kalmbach, R., I. Chizhov, M. C. Schumacher, T. Friedrich, E. Bamberg, and M. Engelhard.** 2007. Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: in situ insertion of bacteriorhodopsin into liposomes. *J Mol Biol* **371**:639-648.
53. **Kapust, R. B., J. Tozser, J. D. Fox, D. E. Anderson, S. Cherry, T. D. Copeland, and D. S. Waugh.** 2001. Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng* **14**:993-1000.
54. **Katragadda, M., J. L. Alderfer, and P. L. Yeagle.** 2001. Assembly of a polytopic membrane protein structure from the solution structures of overlapping peptide fragments of bacteriorhodopsin. *Biophys J* **81**:1029-1036.
55. **Katzen, F., G. Chang, and W. Kudlicki.** 2005. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol* **23**:150-156.
56. **Katzen, F., J. E. Fletcher, J. P. Yang, D. Kang, T. C. Peterson, J. A. Cappuccio, C. D. Blanchette, T. Sulchek, B. A. Chromy, P. D. Hoepflich, M. A. Coleman, and W. Kudlicki.** 2008. Insertion of membrane proteins into discoidal membranes using a cell-free protein expression approach. *J Proteome Res* **7**:3535-3542.
57. **Katzen, F., T. C. Peterson, and W. Kudlicki.** 2009. Membrane protein expression: no cells required. *Trends Biotechnol* **27**:455-460.
58. **Kay, B. K., J. Winter, and J. McCafferty.** 1996. Phage display of peptides and proteins : a laboratory manual. Academic Press, San Diego.
59. **Kiefer, H.** 2003. In vitro folding of alpha-helical membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1610**:57-62.
60. **Kim, T. Y., K. Winkler, and U. Alexiev.** 2007. Picosecond multidimensional fluorescence spectroscopy: a tool to measure real-time protein dynamics during function. *Photochem Photobiol* **83**:378-384.

61. **Klammt, C., F. Lohr, B. Schafer, W. Haase, V. Dotsch, H. Ruterjans, C. Glaubitz, and F. Bernhard.** 2004. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur J Biochem* **271**:568-580.
62. **Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-768.
63. **Knecht, S., D. Ricklin, A. N. Eberle, and B. Ernst.** 2009. Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces. *J Mol Recognit* **22**:270-279.
64. **Kretzschmar, T., C. Zimmermann, and M. Geiser.** 1995. Selection procedures for nonmatured phage antibodies: a quantitative comparison and optimization strategies. *Anal Biochem* **224**:413-419.
65. **Labrijn, A. F., M. H. Koppelman, J. Verhagen, M. C. Brouwer, H. Schuitemaker, C. E. Hack, and H. G. Huismans.** 2002. Novel strategy for the selection of human recombinant Fab fragments to membrane proteins from a phage-display library. *J Immunol Methods* **261**:37-48.
66. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
67. **Lanyi, J. K.** 2006. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim Biophys Acta* **1757**:1012-1018.
68. **le Maire, M., P. Champeil, and J. V. Moller.** 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* **1508**:86-111.
69. **Luckey, M.** 2008. *Membrane structural biology : with biochemical and biophysical foundations.* Cambridge University Press, Cambridge ; New York.
70. **Lyukmanova, E. N., Z. O. Shenkarev, N. F. Khabibullina, G. S. Kopeina, M. A. Shulepko, A. S. Paramonov, K. S. Mineev, R. V. Tikhonov, L. N. Shingarova, L. E. Petrovskaya, D. A. Dolgikh, A. S. Arseniev, and M. P. Kirpichnikov.** 2012. Lipid-protein nanodiscs for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes. *Biochim Biophys Acta* **1818**:349-358.
71. **Madigan, M. T., J. M. Martinko, and T. D. Brock.** 2006. *Brock biology of microorganisms*, 11th ed. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
72. **Malmborg, A. C., M. Duenas, M. Ohlin, E. Soderlind, and C. A. Borrebaeck.** 1996. Selection of binders from phage displayed antibody libraries using the BIAcore biosensor. *J Immunol Methods* **198**:51-57.
73. **Marvin, D. A.** 1998. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr Opin Struct Biol* **8**:150-158.
74. **Menendez, A., and J. K. Scott.** 2005. The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Anal Biochem* **336**:145-157.
75. **Merk, H., C. Gless, B. Maertens, M. Gerrits, and W. Stiege.** 2012. Cell-free synthesis of functional and endotoxin-free antibody Fab fragments by translocation into microsomes. *Biotechniques* **53**:153-160.

76. **Mirzabekov, T., H. Kontos, M. Farzan, W. Marasco, and J. Sodroski.** 2000. Paramagnetic proteoliposomes containing a pure, native, and oriented seven-transmembrane segment protein, CCR5. *Nat Biotechnol* **18**:649-654.
77. **Mizuguchi, H., T. Kubomi, R. Nomura, K. Yasukawa, T. Imanaka, and M. Takagi.** 2000. Screening of an oligopeptide antagonist for interleukin-6 from a random phage library. *Biotechnol Lett* **22**:1015-1020.
78. **Mohrlüder, J., T. Stangler, Y. Hoffmann, K. Wiesehan, A. Mataruga, and D. Willbold.** 2007. Identification of calreticulin as a ligand of GABARAP by phage display screening of a peptide library. *Febs J* **274**:5543-5555.
79. **Molek, P., B. Strukelj, and T. Bratkovic.** 2011. Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors. *Molecules* **16**:857-887.
80. **Morrison, K. L., and G. A. Weiss.** 2001. Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol* **5**:302-307.
81. **Nath, A., W. M. Atkins, and S. G. Sligar.** 2007. Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry* **46**:2059-2069.
82. **Nilsson, F., L. Tarli, F. Viti, and D. Neri.** 2000. The use of phage display for the development of tumour targeting agents. *Adv Drug Deliv Rev* **43**:165-196.
83. **Ohashi, R., H. Mu, X. Wang, Q. Yao, and C. Chen.** 2005. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *Qjm* **98**:845-856.
84. **Olszewski, A., K. Sato, Z. D. Aron, F. Cohen, A. Harris, B. R. McDougall, W. E. Robinson, Jr., L. E. Overman, and G. A. Weiss.** 2004. Guanidine alkaloid analogs as inhibitors of HIV-1 Nef interactions with p53, actin, and p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:14079-14084.
85. **Ovchinnikov, Y. A., N. G. Abdulaev, R. G. Vasilov, I. Y. Vturina, A. B. Kuryatov, and A. V. Kiselev.** 1985. The Antigenic Structure and Topography of Bacteriorhodopsin in Purple Membranes as Determined by Interaction with Monoclonal-Antibodies. *FEBS Lett* **179**:343-350.
86. **Overington, J. P., B. Al-Lazikani, and A. L. Hopkins.** 2006. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**:993-996.
87. **Pashkov, V. S., T. Mareeva, T. A. Balashova, A. A. Vychalkovskii, L. V. Samokhvalova, L. K. Baidakova, I. L. Rodionov, and V. A. Nesmeianov.** 2002. [Bacteriorhodopsin retains the conformation of Val69-Gly72 fragment during functioning]. *Bioorg Khim* **28**:109-117.
88. **Pebay-Peyroula, E., G. Rummel, J. P. Rosenbusch, and E. M. Landau.** 1997. X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* **277**:1676-1681.
89. **Petsch, D., and F. Birger Anspach.** 2000. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotech* **76**: 97-119.
90. **Popot, J. L.** 2010. Amphipols, nanodiscs, and fluorinated surfactants: three nonconventional approaches to studying membrane proteins in aqueous solutions. *Annu Rev Biochem* **79**:737-775.
91. **Raetz, C. R., and C. Whitfield.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**:635-700.

92. **Raschle, T., S. Hiller, M. Etzkorn, and G. Wagner.** 2010. Nonmicellar systems for solution NMR spectroscopy of membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* **20**:471-479.
93. **Renart, J., J. Reiser, and G. R. Stark.** 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:3116-3120.
94. **Rigaud, J. L., B. Pitard, and D. Levy.** 1995. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1231**:223-246.
95. **Rowley, M. J., K. O'Connor, and L. Wijeyewickrema.** 2004. Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions. *Biotechnol Annu Rev* **10**:151-188.
96. **Rubin, B., M. J. Antonaccio, and Z. P. Horovitz.** 1978. Captopril (SQ 14,225) (D-3-mercapto-2-methylpropanoyl-L-proline): a novel orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme and antihypertensive agent. *Prog Cardiovasc Dis* **21**:183-194.
97. **Russel, M., H. Whirlow, T. P. Sun, and R. E. Webster.** 1988. Low-frequency infection of F-bacteria by transducing particles of filamentous bacteriophages. *J Bacteriol* **170**:5312-5316.
98. **Sanger, F., and A. R. Coulson.** 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* **94**:441-448.
99. **Schootink, H., and S. Rose-John.** 2005. Designing cytokine variants by phage-display. *Comb Chem High Throughput Screen* **8**:173-179.
100. **Schwarz, D., V. Dotsch, and F. Bernhard.** 2008. Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Proteomics* **8**:3933-3946.
101. **Seddon, A. M., P. Curnow, and P. J. Booth.** 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* **1666**:105-117.
102. **Seigneuret, M., and J. L. Rigaud.** 1985. Use of the Fluorescent Ph Probe Pyranine to Detect Heterogeneous Directions of Proton Movement in Bacteriorhodopsin Reconstituted Large Liposomes. *FEBS Lett* **188**:101-106.
103. **Shih, A. Y., P. L. Freddolino, S. G. Sligar, and K. Schulten.** 2007. Disassembly of nanodiscs with cholate. *Nano Lett* **7**:1692-1696.
104. **Sidhu, S. S.** 2005. Phage display in biotechnology and drug discovery. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton.
105. **Sidhu, S. S., and S. Koide.** 2007. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. *Curr Opin Struct Biol* **17**:481-487.
106. **Slonczewski, J., and J. W. Foster.** 2011. Microbiology : an evolving science, 2nd ed. W.W. Norton, New York.
107. **Smith, G. P.** 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**:1315-1317.
108. **Stryer, L.** 1995. Biochemistry, 4th ed. W.H. Freeman, New York.
109. **Sumper, M., H. Reitmeier, and D. Oesterhelt.** 1976. Biosynthesis of the purple membrane of halobacteria. *Angew Chem Int Ed Engl* **15**:187-194.

110. **Tanford, C.** 1980. The hydrophobic effect : formation of micelles and biological membranes, 2d ed. Wiley, New York.
111. **Trachtenberg, J.** 1983. The treatment of metastatic prostatic cancer with a potent luteinizing hormone releasing hormone analogue. *J Urol* **129**:1149-1152.
112. **Tran, T., S. Hoffmann, K. Wiesehan, E. Jonas, C. Luge, A. Aladag, and D. Willbold.** 2005. Insights into human Lck SH3 domain binding specificity: different binding modes of artificial and native ligands. *Biochemistry* **44**:15042-15052.
113. **Turner, G. J., S. Chittiboyina, L. Pohren, K. G. Hines, J. J. Correia, and D. C. Mitchell.** 2009. The bacteriorhodopsin carboxyl-terminus contributes to proton recruitment and protein stability. *Biochemistry* **48**:1112-1122.
114. **Van Weemen, B. K., and A. H. Schuurs.** 1971. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* **15**:232-236.
115. **Vithayathil, R., R. M. Hooy, M. J. Cocco, and G. A. Weiss.** 2011. The scope of phage display for membrane proteins. *J Mol Biol* **414**:499-510.
116. **Vodnik, M., U. Zager, B. Strukelj, and M. Lunder.** 2011. Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules* **16**:790-817.
117. **Vrielink, J., M. S. Heins, R. Setroikromo, E. Szegezdi, M. M. Mullally, A. Samali, and W. J. Quax.** 2010. Synthetic constrained peptide selectively binds and antagonizes death receptor 5. *FEBS J* **277**:1653-1665.
118. **Wagner, S., M. L. Bader, D. Drew, and J. W. de Gier.** 2006. Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends Biotechnol* **24**:364-371.
119. **Wallin, E., and G. von Heijne.** 1998. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* **7**:1029-1038.
120. **Wang, F. Y., T. Y. Zhang, J. X. Luo, G. A. He, Q. L. Gu, and F. Xiao.** 2006. Selection of CC chemokine receptor 5-binding peptide from a phage display peptide library. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:2035-2041.
121. **Wang, J., S. Link, C. D. Heyes, and M. A. El-Sayed.** 2002. Comparison of the dynamics of the primary events of bacteriorhodopsin in its trimeric and monomeric states. *Biophys J* **83**:1557-1566.
122. **Werck-Reichhart, D., and R. Feyereisen.** 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* **1**:REVIEWS3003.
123. **Yamaguchi, N., Y. Jinbo, M. Arai, and K. Koyama.** 1993. Visualization of the morphology of purple membrane surfaces by monoclonal antibody techniques. *FEBS Lett* **324**:287-292.
124. **Zakharova, M. Y., A. V. Kozyr, A. N. Ignatova, I. A. Vinnikov, I. G. Shemyakin, and A. V. Kolesnikov.** 2005. Purification of filamentous bacteriophage for phage display using size-exclusion chromatography. *Biotechniques* **38**:194, 196, 198.

8 ANHANG

8.1 SEQUENZEN

Proteinsequenz von bR:

MQAQITGRPEWIWLALGTALMGLGTLYFLVKGMGVSDPDAKKFYAITTLVPAIAFTMY
LSMLLGYGLTMVPFGGEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADQGTTILALVGAD
GIMIGTGLVGALTKVYSYRFVWWAISTAAMLYILYVLFFGFTSKAESMRPEVASTFKVL
RNVTVVLWSAYPVVWLIGSEGAGIVPLNIETLLFMVLDVSAKVGFGILLRSRAIFGEAE
APEPSAGDGAAATSSKGHHHHHH

Proteinsequenz von MSP1:

MGSSHHHHHHENLYFQGLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEG
QEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQE
KLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALKENGGARLAEYHAKA
TEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

8.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ABC	ATP-Bindungskassette	HMW	high molecular weight
Abb.	Abbildung	HRP	horseradish peroxidase
ACE	Angiotensin- konvertierendes Enzym	IgG	Immunglobulin G
APS	Ammoniumpersulfat	IMAC	Metalaffinitätschelchromatogra- phie
ATP	Adenosintriphosphat	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
bp	Basenpaar	kb	Kilobasen
BSA	Rinderserumalbumin	λ	Wellenlänge
bR	Bakteriorhodopsin	LB	lysogenic broth
C	Cytosin	LMW	low molecular weight
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat	LPS	Lipopolysaccharid
CCR5	CC-Motiv-Chemokin- Rezeptor 5	mRNA	messenger RNA
cmc	kritische Mizellbildungs- konzentration	MSP	membrane scaffold protein
C- Terminus	Carboxy-Terminus	MW	Molekulargewicht
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero- 3-phosphocholin	MWCO	molecular weight cut off
DMSO	Dimethylsulfoxid	NaAc	Natriumacetat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I	NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
dNTP	Desoxyribonukleotid	N- Terminus	Amino-Terminus
DTT	Dithiothreitol	OD	optische Dichte
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
ε	Extinktionskoeffizient	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PCR	Polymerasekettenreaktion
ER	Endoplasmatisches Retikulum	PEG	Polyethylenglycol
F	Fruchtbarkeit	PVDF	Polyvinylidenfluorid
Fab	fragment antigen binding	RBS	Ribosomenbindestelle
FDA	Food and Drug Administration	RF	Replikative Form
G	Guanin	RNA	Ribonukleinsäure
GDP	Guanosindiphosphat	rpm	Umdrehungen pro Minute
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	scFV	single chain variable fragment
GTP	Guanosintriphosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
HDL	high density lipoprotein	SEC	Größenausschlusschromatograp- hie
hfr	high frequency of recombination		

SPR	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	Tet	Tetrazyklin
ssDNA	einzelsträngige DNA	TEV	tobacco etch virus
T	Thymidin	Tris	Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan
TBS	Tris-gepufferte Saline	Ttds	((N-(3-{2-[2-(3-Amino-propoxy)-ethoxy]-ethoxy}-propyl)-succinamic acid
TE	Tris-EDTA	UV	Ultraviolett
TEMED	Tetramethylethyldiamin	wt	Wildtyp

8.3 AMINOSÄUREN

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

8.4 PUBLIKATIONEN UND POSTERPRÄSENTATIONEN

Publikationen:

Pavlidou, M., Hänel, K., Möckel, L., Willbold, D. 2013. Nanodiscs Allow Phage Display Selection for Ligands to Non-Linear Epitopes on Membrane Proteins. PLoS ONE 9, e72272

Posterpräsentationen:

Pavlidou M., Hänel K., Möckel L., Willbold D. Nanodiscs allow phage display selection for ligands to non-linear epitopes on membrane proteins

EMBO-Konferenz "Allosteric interactions in cell signaling and regulation", Mai 2013, Paris

Pavlidou M., Hänel K., Willbold D. Application of nanodiscs in biotechnology: using nanodiscs in phage display

2. internationalen CLIB²⁰²¹ Konferenz, April 2011, Düsseldorf

8.5 DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die hervorragende Laborausstattung. Weiterhin möchte ich ihm für seine Betreuung und Unterstützung, seine motivierende Art und seinen Optimismus danken.

PD Dr. Bernd König danke für die Erstellung des Zweitgutachtens und für seine Diskussionsbereitschaft.

Ein großer Dank gilt Dr. Karen Hänel für ihre großartige Betreuung während der gesamten Doktorarbeit, für ihre Hilfestellung bei den zahlreichen Problemen, die leider viel zu oft auftraten, und für ihr offenes Ohr bei wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Angelegenheiten.

Der Graduiertenschule „CLIB – Graduate Cluster Industrial Biotechnology“ danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines dreijährigen Stipendiums und von Sachmitteln, die interdisziplinäre Ausbildung und für die Möglichkeit, mich mit anderen Stipendiaten auszutauschen.

Dr. Jeannine Mohrlüder möchte ich für das Einlernen und die Unterstützung in den Phagendisplayselektionen danken.

Luis Möckel danke ich für seine stete Hilfe in strukturelle Fragestellungen, für seine zumeist aufbauende Art und für die unterhaltsamen Kaffeepausen.

Meinen ehemaligen und aktuellen Bürokolleginnen, Alexandra Boeske, Claudia Börger, Laura Kukuk und Silke Dornieden, bin ich für vieles dankbar: dem wissenschaftlichen Austausch, die Diskussion von experimentellen und nicht-experimentellen Problemen, die tolle Atmosphäre, die zahlreichen Gespräche, die manchmal nötig sind, um die Motivation aufrechtzuerhalten, die privaten Unternehmungen und vieles mehr.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich immer moralisch unterstützt und an mich geglaubt haben. Ohne sie wäre dies nicht möglich gewesen.

8.6 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Datum, Ort

Unterschrift

Band / Volume 67

**Adsorption of (hetero-)organic Phthalocyanine
and PTCDA thin films on Ag(111)**

C. Kleimann (2013), iv, 149 pp

ISBN: 978-3-89336-888-4

Band / Volume 68

**High-energy high-momentum surface spin waves of ultrathin epitaxial 3d
transition metal films**

R. Jayaraman (2013), ix, 135 pp

ISBN: 978-3-89336-890-7

Band / Volume 69

Magnetic Oxide Heterostructures: EuO on Cubic Oxides and on Silicon

C. Caspers (2013), xiii, 153 pp

ISBN: 978-3-89336-891-4

Band / Volume 70

**Femtosecond Spin Dynamics in Magnetic Multilayers Employing High
Harmonics of Laser Radiation**

D. Rudolf (2013), vi, 121 pp

ISBN: 978-3-89336-894-5

Band / Volume 71

**Development and application of a massively parallel
KKR Green function method for large scale systems**

A. R. Thieß (2013), ii, 173 pp

ISBN: 978-3-89336-906-5

Band / Volume 72

**Conformational Dynamics of Calmodulin and Ribosome-Nascent Chain
Complexes Studied by Time-Resolved Fluorescence Anisotropy**

P. Lamprou (2013), 182 pp

ISBN: 978-3-89336-907-2

Band / Volume 73

Stereoselective synthesis of vicinal diols with enzymatic cascade reactions

J. Kulig (2013), XV, 177 pp

ISBN: 978-3-89336-911-9

Band / Volume 74

Computing Solids

Models, ab-initio methods and supercomputing

Lecture Notes of the 45th IFF Spring School 2014

March 10 – 21, 2014 Jülich, Germany

ed. by S. Blügel, N. Helbig, V. Meden, D. Wortmann (2014), ca. 1000 pp

ISBN: 978-3-89336-912-6

Band / Volume 75

Aberrationskorrigierte Photoemissionsmikroskopie an magnetischen Systemen: Von statischer Charakterisierung zu zeitaufgelöster Abbildung

F. Nickel (2013), x, 99 pp

ISBN: 978-3-89336-913-3

Band / Volume 76

Temperature-Induced Metamagnetic Transition and Domain Structures of Single-Crystalline FeRh Thin Films on MgO(100)

X. Zhou (2013), xi, 104 pp

ISBN: 978-3-89336-919-5

Band / Volume 77

Interplay between Magnetism and Superconductivity in Iron Based High Temperature Superconductors

S. Price (2013), 196 pp

ISBN: 978-3-89336-921-8

Band / Volume 78

Magnetoresistance and transport in carbon nanotube-based devices

C. Morgan (2013), viii, 131 pp

ISBN: 978-3-89336-926-3

Band / Volume 79

Development of a relativistic full-potential first-principles multiple scattering Green function method applied to complex magnetic textures of nano structures at surfaces

D. Bauer (2014), 193 pp

ISBN: 978-3-89336-934-8

Band / Volume 80

Identifizierung von artifiziellen Liganden eines in Nanodiscs inkorporierten integralen Membranproteins

M. Pavlidou (2014), 106 pp

ISBN: 978-3-89336-942-3

Weitere **Schriften des Verlags im Forschungszentrum Jülich** unter
<http://www.zb1.fz-juelich.de/verlagextern1/index.asp>



Schlüsseltechnologien / Key Technologies
Band / Volume 80
ISBN 978-3-89336-942-3

